

# Rôle des récepteurs Toll-like et de CD14 dans la réponse à Listeria monocytogenes et à la flagelline extraite de Salmonella typhimurium

Laure Janot

▶ **To cite this version:**

Laure Janot. Rôle des récepteurs Toll-like et de CD14 dans la réponse à Listeria monocytogenes et à la flagelline extraite de Salmonella typhimurium. Sciences agricoles. Université d'Orléans, 2009. Français. NNT : 2009ORLE2014 . tel-00452680

**HAL Id: tel-00452680**
**https://theses.hal.science/tel-00452680**

Submitted on 2 Feb 2010

**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 D'ORLÉANS

*ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES*

**LABORATOIRE d'IMMUNOLOGIE ET d'EMBRYOLOGIE MOLECULAIRE**

# THÈSE présentée par :

**Laure JANOT**

soutenue le : **18 février 2009**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire/Immunologie

## Rôle des récepteurs Toll-like et de CD14 dans la réponse à *Listeria monocytogenes* et à la flagelline extraite de *Salmonella typhimurium*

**THÈSE dirigée par :**

| | |
|---|---|
| **Dr. François Erard** | Professeur, Université des Sciences d'Orléans |
| **Dr. Bernard Ryffel** | Directeur de recherche, UMR 6218 Orléans |

**RAPPORTEURS :**

| | |
|---|---|
| **Dr. Irène Garcia-Gabay** | Chargée de cours, Université de Genève |
| **Dr. Dominique Buzoni-Gatel** | Directrice de recherche, INRA de Tours |

---

**JURY**

| | |
|---|---|
| **Dr. Pascale Cossart** | Directrice de recherche, Institut Pasteur Paris |
| **Dr. Irène Garcia-Gabay** | Chargée de cours, Université de Genève |
| **Dr. Dominique Buzoni-Gatel** | Directrice de recherche, INRA de Tours |
| **Dr. Jean-Claude Sirard** | Chargé de recherche, INSERM U801 Lille |
| **Dr. François Erard** | Professeur, Université des Sciences d'Orléans |
| **Dr. Bernhard Ryffel** | Directeur de recherche, UMR6218 Orléans |

# REMERCIEMENTS

*Au terme de ce travail, je souhaiterais remercier chaleureusement tous ceux qui m'ont permis de près ou de loin de mener à bien ces études.*

*Je remercie, en premier lieu,* ***Valérie Quesniaux*** *et* ***Bernhard Ryffel*** *qui m'ont accueillie au sein du laboratoire et conseillée durant ces trois années.*

*Je tiens également à remercier* ***François Erard*** *pour cette petite visite du laboratoire, elle aura finalement duré presque cinq ans ! Merci pour vos conseils, votre passion de l'immunologie et pour toutes les discussions animées, pas forcément scientifiques, que nous avons pu avoir. Merci d'être resté humain et d'avoir su m'encourager dans certains moments de doutes.*

*Merci aux* ***Dr. Irène Garcia*** *et* ***Dominique Buzoni-Gatel*** *de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de mes travaux. Merci également aux* ***Dr. Pascale Cossart*** *et* ***Jean-Claude Sirard*** *d'avoir accepté de faire partie de mon jury.*

*J'ai une pensée particulière pour ma petite* ***Violette****. Bien plus qu'une collègue ou copine de bureau, tu es une amie comme il y en a peu. Merci pour ta sincérité, ton intégrité, ta gentillesse, ta bonne humeur et tes coups de gueules aussi…..Tu vas me manquer. Tu auras contribué de beaucoup à mon épanouissement. Nouvelle-Zélande, Canada ou Australie, qu'importe, je sais que l'on se reverra.*

*J'aimerais également adresser un clin d'œil spécial à* ***Stéphanie*** *ma petite Rose. Quelqu'un a dit un jour que tu étais le pilier du labo…* *c'est vrai ! Talentueuse, calme, réservée juste ce qu'il faut, pleine d'humour……tu es tout à la fois. J'ai aimé ton regard (souvent malicieux) et ton recul sur beaucoup de choses de la vie. Tu ne le sais sans doute pas, mais tu as toujours été pour moi un exemple d'intelligence, d'intégrité, de gentillesse mais aussi d'esprit critique. Tu m'as beaucoup touchée.*

*Un grand merci à tous les membres de l'IEM pour tous les bons moments que l'on a partagé : **Thomas**, **Paméla**, **Sabine**, **Nathalie**, **Mathilde**, **Anne-Gaëlle**, **Isa**, **Nicolas**, **Dieudonnée**, **Rachel**, **Isabelle**, et **Améziane**. Vous m'avez permis de passez sereinement trois superbes années, dans la bonne humeur et le dynamisme.*

*Un clin d'œil spécial aux « anciens », **Marielle**, **Nicolas le pirate**, **Victorine**, **Emilie**, **Mathias** et **Caroline**. Merci pour votre convivialité, vos idées nouvelles (parfois farfelues, il faut le dire !) et nos discussions pour refaire le monde.*

*Je remercie également aux **GDP** pour leur enthousiasme et leur bonne humeur ainsi que le **CDTA** pour toute la gestion des lignées de souris.*

*Merci à la **MagFamily** pour votre soutien, vos éclats de rire et nos repas animés depuis maintenant 7 ans. Je suis heureuse de faire partie de votre famille.*

*Un merci tout particulier à ma petite tribu : **Papa**, **Maman**, **Lucie**, **Laurent** mais aussi **Julien** et **Justine**. Les mots me manquent pour exprimer toute ma gratitude. Je vous dirai simplement que vos encouragements et votre amour m'ont portée jusqu'ici ! Merci pour tout le bonheur que vous m'apportez.*

*Mes derniers remerciements vont naturellement vers mon mari, **François**. Merci d'être là tous les jours pour me soutenir et m'aimer. J'espère être à la hauteur de tout ce bonheur que tu me donnes. Bien plus qu'un mari, tu es ma moitié et cette réussite est la tienne. Merci également de m'avoir donné un aussi beau « petit » **Léandre**…je pense qu'il sera aussi adorable que toi. Je vous aime tous les deux.*

# LISTE DES ABBREVIATIONS

| | |
|---|---|
| **Ac** | Anticorps |
| **ActA** | Actine A |
| **ADN** | Acide Désoxyribonucléique |
| **AFSSA** | Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments |
| **Ag** | Antigène |
| **AMDC** | Airway Mucosal Dendritic Cell |
| **ARN** | Acide Ribonucléique |
| **ARN db** | Acide Ribonucléique Double Brin |
| **Arp** | Actin-Related Protein |
| **ASC** | Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD domain |
| **BCG** | Bacille de Calmette et Guérin |
| **BIR** | Baculovirus Inhibitor of Repeat |
| **BLP** | Bacterial Lipopeptide : Pam3CysSerLys4 |
| **CCR2** | CC-chemokine receptor 2 |
| **CNRL** | Centre National de Référence des Listéria |
| **CRD** | Cystein Rich Domain |
| **CR3** | Complément Receptor 3 |
| **CMH** | Complexe Majeur d'Histocompatibilité |
| **CPA** | Cellule Présentatrice d'Antigène |
| **DC** | Dendritic Cell |
| **DD** | Death Domain |
| **DN-TNF** | Dominant–negative TNF |
| **GAGs** | Glycoaminoglycanes |
| **GFP** | Green Fluorescent Protein |
| **GM-CSF** | Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor |
| **GPI** | GlycoPhosphatidylInositol |
| **HBD** | Humanβ-Defensin |
| **HGF** | Hépatocyte Growth Factor |

| | |
|---|---|
| **HKLM** | Heat Killed *Listeria monocytogenes* |
| **IFN** | Interféron |
| **Ig** | Immunoglobuline |
| **IKK** | IκB Kinase |
| **IL** | Interleukine |
| **Inl** | Internaline |
| **iNOS** | inducible Nitric Oxid Syntase |
| **InVs** | Institut de Veille Sanitaire |
| **Ipaf** | Ice Protease Activating Factor |
| **IP-10** | IFNγ-induced Protein of 10 kDa |
| **IRAK** | IL-1 Receptor Associated Kinase |
| **IRF3** | Interferon Regulated Factor 3 |
| **KC** | Keratinocyte-derived Chemokine |
| **KO** | Knock-Out |
| **LAM** | Lipoarabinomannane |
| **LB** | Lymphocyte B |
| **LBP** | LPS Binding Protein |
| **LFA1** | Leukocytes Function-Associated Antigen 1 |
| **LLO** | Listériolysine |
| **Lm** | *Listeria monocytogenes* |
| **LPS** | LipoPolySaccharide |
| **LRR** | Leucine Rich Repeat |
| **LTA** | LipoTeichoic Acid |
| **LT** | Lymphotoxine |
| **MALP-2** | Lipopeptide diacylé mycobactérien |
| **ManLAM** | LAM portant une coiffe mannosylé |
| **MBL** | Mannose-Binding Lectine |
| **MCP-1** | Monocytes Chemoattractant Protein |
| **MDA-5** | Melanoma Differenciation-Associated gene-5 |
| **MDP** | Muramyl DiPeptide |
| **Mem-TNF** | TNF Membranaire |

| | |
|---|---|
| **M-CSF** | Macrophage Colony Stimulating Factor |
| **MTT** | Mitonchondrial TeTrazolium |
| **MyD88** | Myeloid Differentiation factor 88 |
| **Naip5** | NLR family apoptosis inhibitory protein 5 |
| **NBD** | Nucleotide Binding Domain |
| **NEMO** | IKK-γ/NF-κB Essential Modulator |
| **NFκB** | Nuclear Factor kappaB |
| **NLR** | Nucleotide binding Oligomerization Domain (NOD)-Like receptor |
| **NK** | Natural Killer |
| **NO** | Nitric Oxide - Oxyde Nitrique |
| **PAMP** | Pathogen-Associated Microbial Patterns |
| **PGN** | PeptidoGlycaNes |
| **pH** | Potentiel Hydrogène |
| **PI-PLC** | PhosphatidylInositol PhosphoLipase C |
| **PolyIC** | Polyinosine-deoxycytidylic acid |
| **PRR** | Pattern Recognition Receptors |
| **RE** | Reticulum Endoplasmique |
| **RIP** | Receptor Interactive Protein |
| **RLH** | Retinoic Acid-inductible gene-I (RIG-I)-like Helicase |
| **SCID** | Severe Combined Immunodeficiency |
| **SOD** | Superoxyde Dismutase |
| **SP** | Surfactant Protéique |
| **SRA** | Class-A scavenger Receptor |
| **sTNF** | soluble Tumor Necrosis Factor |
| **TACE** | TNFα Converting Enzyme |
| **TAK1** | TGF-ß activated kinase 1 |
| **TCR** | T Cell Receptor |
| **TGFβ** | transforming Growth Factor |
| **TipDCs** | TNF- and iNOS Producing Dendritic Cells |
| **TIR** | Toll/IL-1 Receptor |
| **TIRAP/Mal** | TIR domain-containing Adaptor Protein/MyD88-adaptor-like |

| | |
|---|---|
| **TLR** | Toll-Like Receptor |
| **TNF** | Tumor Necrosis Factor |
| **TNFR** | Tumor Necrosis Factor Receptor |
| **TRADD** | TNFR Associated Death Domain |
| **TRAF** | TNF Receptor Associated Factor |
| **TRAM** | Trif-Related Adaptor Molecule |
| **TRIF/TICAM** | TIR domain-containing adaptor inducing IFNβ/TIR domain-containing Adaptor Molecule |
| **VASP** | VAsodilator-Stimulated Protein |
| **VIH** | Virus de l'Immunodéfiance Humaine |

# TABLE DES MATIERES

**LISTE DES ABBREVIATIONS ..... 4**

**TABLE DES MATIERES ..... 8**

**OBJECTIFS ..... 10**

**INTRODUCTION ..... 13**

**Chapitre 1 : L'immunité innée, une défense rapide** ..... 14
1. La mise en place de l'inflammation ..... 14
   1.1. Les cytokines de l'inflammation ..... 16
   1.2. Le TNF, médiateur de l'inflammation ..... 16
2. Le mécanisme de phagocytose ..... 21
3. Les récepteurs Toll-like ..... 23
   3.1. La découverte des TLR ..... 23
   3.2. La structure des TLR ..... 23
   3.3. Les TLR et leurs ligands ..... 24
   3.4. Les voies de signalisation induites par l'activation des TLR ..... 25
   3.5. La localisation cellulaire des TLR ..... 28
   3.6. CD14 est un des co-récepteurs associés aux TLR ..... 28
4. Les récepteurs NLR et RIG-I : des récepteurs LRR intracytoplasmiques ..... 30

**Chapitre 2 : *Listeria monocytogenes*** ..... 35
1. Découverte et description de L. *monocytogenes* ..... 35
2. Manifestations cliniques de la listériose et population à risque ..... 36
3. Epidémiologie et veille sanitaire ..... 37
4. Traitements ..... 38
5. Mode d'infection au niveau des organes ..... 39
6. Dissémination intracellulaire ..... 40
7. Mise en place de la réponse immunitaire de l'hôte en réponse à l'infection par Listéria *monocytogenes* ..... 46

**Chapitre 3 : Etude de l'inflammation pulmonaire induite par la flagelline extraite de Salmonella *typhimurium*** ..... 54
1. Le système respiratoire ..... 54
2. Les systèmes de défenses pulmonaires non spécifiques ..... 56
   2.1. L'épithélium pulmonaire ..... 56
   2.2. La clairance muco-ciliaire ..... 57
   2.3. Composition du mucus ..... 58
3. Les acteurs du système immunitaire pulmonaire ..... 59
   3.1. Les macrophages alvéolaires ..... 59

3.2. Les cellules dendritiques ..... 61
3.3. Les neutrophiles ..... 63
4. La flagelline, constituant du flagelle bactérien ..... 63
5. Détection de la flagelline par le système immunitaire ..... 65
5.1. Détection extracellulaire de la flagelline et signalisation ..... 66
5.2. Détection de la flagelline cytoplasmique et signalisation ..... 68
5.3. Quelle est la contribution de TLR5 et d'Ipaf dans la détection de la flagelline ? ..... 69

**RESULTATS ..... 71**

**Chapitre 1 : Etude de la réponse immunitaire innée après administration par voie veineuse de Listéria *monocytogenes*.** ..... 72

**Article 1:** CD14 Works With Toll-Like Receptor 2 To Contribute To Recognition and Control of *Listeria monocytogenes* Infection.
Laure Janot, Thomas Secher, David Torres, Isabelle Maillet, Josef Pfeilschifter, Valerie F. J. Quesniaux, Regine Landmann, Bernhard Ryffel and François Erard. Journal of Infection disease, 2008:198. ..... 72

**Article 2:** Membrane Tumor Necrosis Factor Confers Partial Protection to *Listeria* Infection.
David Torres, Laure Janot, Valérie F.J. Quesniaux, Sergei I. Grivennikov, Isabelle Maillet, Jonathon D. Sedgwick, Bernhard Ryffel and François Erard. American Journal of Pathology, 2005:167. ..... 85

**Article 3:** Dominant-Negative Inhibitor of Soluble TNF Attenuate Experimental Arthritis Without Suppressing Innate Immune Response
Jonathan Zalevsky, Thomas Secher, Serguei A. Ezhevsky, Laure Janot, Paul M. Steed Christopher O'Brien, Araz Eivazi, James Kung, Duc-Hanh T. Nguyen, Stephen K. Doberstein, François Erard, Bernhard Ryffel and David E. Szymkowski. The Journal Of Immunology, 2007:179 ..... 98

**Chapitre 2 : Etude du rôle des TLR5, TLR4 et du co-récepteur CD14 dans l'inflammation pulmonaire induite par la flagelline** ..... 111

**Article 4:** Radioresistant cells expressing toll-like receptor 5 control the respiratory epithelium's innate immune responses to flagellin (en 2ème revue à European Journal of Immunology)
Laure Janot, Jean-Claude Sirard, Thomas Secher, Nicolas Noulin, Lizette Fick, Shizuo Akira, Satoshi Uematsu, Arnaud Didierlaurent, Tracy Hussell, Bernhard Ryffel, François Erard ..... 111

**DISCUSSION ..... 144**

**BIBLIOGRAPHIE ..... 154**

# OBJECTIFS

Les études que j'ai réalisées durant ma thèse portent principalement sur les récepteurs et médiateurs de la réponse immunitaire innée à *Listeria monocytogenes* (L.m) et à la flagelline issue de *Salmonella typhimurium*.

La réponse immunitaire innée contre Listéria requiert l'intervention de PRR spécifiques nommés Toll-Like Receptor (TLR). L.m est ainsi reconnu par le TLR2 afin d'informer l'organisme de l'entrée de la bactérie. Les TLR nécessitent quelquefois l'aide de co-récepteur afin d'optimiser la réponse immunitaire. J'ai ainsi étudié l'implication du co-récepteur CD14 dans l'infection par Listéria. CD14 participe avec TLR4 dans la reconnaissance de composés comme le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram-négative. Ce co-récepteur permet à l'organisme à détecter de faibles quantités de LPS et permet ainsi l'activation des cellules immunitaires et la synthèse de cytokines en réponse à l'infection. Mes travaux de thèse ont analysé l'intervention de CD14 dans la réponse immunitaire innée contre Listéria administrée par voie veineuse.

L'infection par L.m engendre par ailleurs la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF$\alpha$, l'IL-12 ou l'IL-6. TNFa est une molécule importante de la régulation de l'inflammation et du recrutement de cellules immunitaires sur le lieu de l'inflammation. Cette protéine est synthétisée sous forme membranaire (Mem-TNF) et peut être clivée en TNF soluble (sTNF). Beaucoup d'études ont montré l'implication du TNF soluble dans la mise en place de la réponse innée contre Listéria. En revanche, le rôle du Mem-TNF dans l'inflammation est beaucoup moins connu. L'utilisation de souris n'exprimant que la forme non clivable du TNF m'a permis de mettre en évidence le rôle de ce dernier dans l'infection par Listéria. L'étude du modèle d'infection par L.m vient ainsi compléter notre connaissance des mécanismes de défense et ouvre des portes sur d'autres projets intéressants portant par exemple sur les traitements anti-TNF administrés à certains patients souffrant de maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn ou le psoriasis. En effet, ces traitements reposent sur la neutralisation aussi bien du sTNF que du Mem-TNF, provoquant des effets secondaires liés à l'affaiblissement du système immunitaire de l'organisme. Certains patients sont ainsi sujets aux maladies opportunistes et de nouvelles stratégies sont mises en place afin de soigner les malades sans pour autant trop affaiblir leur système immunitaire. La fabrication d'un dominant négatif du TNF permet d'inhiber

uniquement le sTNF et laisse actif le Mem-TNF, contrairement aux traitements actuel qui inhibent les deux formes de cette cytokine.

Une deuxième partie de ma thèse m'a également permis d'étudier l'immunité innée au niveau de la muqueuse pulmonaire. Mes travaux ont porté sur la réponse de l'épithélium pulmonaire induite par administration intranasale de flagelline obtenue à partir de *Salmonella typhimurium*. La flagelline est un composant du flagelle de certaines bactéries et reconnue par TLR5. Certains travaux ont montré que le TLR5 pouvait former un hétérodimère avec TLR4 dans la réponse à la flagelline et j'ai donc voulu vérifier cette hypothèse grâce à l'utilisation de souris déficientes. De plus, le co-recepteur CD14 intervient comme nous l'avons vu avec TLR4, TLR2 et TLR3 dans la détection de leur ligand. C'est donc naturellement que j'ai voulu étudier la piste de la détection de la flagelline par CD14 associé au TLR5 ou TLR4.
La génération de souris chimériques pour TLR5 m'a par ailleurs permis d'étudier les rôles respectifs des cellules épithéliales et des cellules d'origine myéloïde dans la production de chimiokines et de cytokines en réponse à l'inhalation de flagelline.

Les objectifs de ma thèse auront été d'étudier l'implication du CD14 avec TLR2 dans la réponse à l'infection systémique par Listéria. La détection de ce pathogène induit la production de cytokines inflammatoires et je me suis particulièrement intéressée au rôle du Mem-TNF dans l'infection par cette bactérie.

Par ailleurs, l'administration intranasale de la flagelline m'a permis d'étudier précisément la réponse de la muqueuse pulmonaire. Ainsi, CD14 peut-il intervenir avec TLR5 ou avec l'hétérodimère TLR5-TLR4 dans la reconnaissance de cette protéine microbienne ? De plus, quels sont précisément les rôles des cellules épithéliales et des cellules myéloides dans cette inflammation.

# INTRODUCTION

# Chapitre 1 : L'immunité innée, une défense rapide

Continuellement exposé à divers agents infectieux comme les virus ou les bactéries, l'organisme doit mettre en place une réponse immunitaire adéquate pour se protéger. Afin d'éliminer ces pathogènes, les mammifères ont ainsi développé des systèmes de défense qui reposent sur deux composantes, à savoir l'immunité innée et l'immunité acquise.

L'immunité innée intervient en première ligne de défense. Elle induit une inflammation en faisant intervenir dès les premières heures de l'infection les cellules immunitaires comme les macrophages, les neutrophiles ou les cellules dendritiques (DC) afin de phagocyter les agents infectieux et faciliter la réponse immunitaire acquise. Cette dernière se met donc en place un peu plus tardivement et se caractérise par l'activation et l'expansion clonale des lymphocytes possédant des récepteurs spécifiques de l'agent infectieux. L'immunité innée n'est pas dénuée de toute spécificité de reconnaissance puisqu'elle dispose de récepteurs nommés PRRs pour Pattern-Recognition Receptors. Ces PRR reconnaissent sur la paroi de l'agent infectieux des motifs invariants désignés PAMPs pour Pathogen-Associated Molecular Patterns. Les récepteurs de l'immunité innée sont exprimés de manière constitutive et non clonale afin de permettre la mise en place rapide de la réponse immunitaire innée. Ces PRR reconnaissent des PAMPs particuliers, activent des voies de signalisations spécifiques également et conduisent à une réponse propre au pathogène.

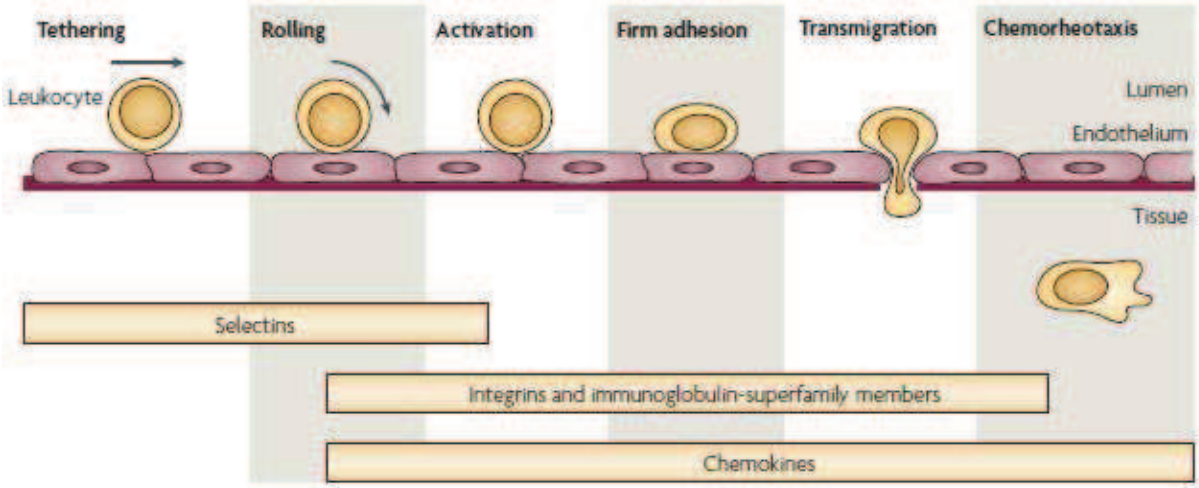
## 1. La mise en place de l'inflammation

L'inflammation est une réponse immédiate de notre organisme déclenchée par une agression d'origine chimique, physique (fracture, entorse) ou due à une infection (par des bactéries, virus parasites ou champignons). Définie cliniquement il y a 2000 ans par un médecin romain nommé Celse, l'inflammation se caractérise par quatre symptômes : rougeur, oedem, chaleur et douleur.

Les capillaires sanguins se dilatent localement au niveau de la plaie ou de l'infection et crée ainsi un appel de sang expliquant la rougeur de la peau. L'histamine et la sérotonine sont des médiateurs agissant sur la vasodilatation et sur l'augmentation de

la perméabilité vasculaire. Les cellules immunitaires présentes dans les vaisseaux, telles que les macrophages ou les neutrophiles, vont se fixer à l'endothélium et traverser la paroi capillaire afin d'exercer leur rôle de phagocytose ou de production de médiateurs de l'inflammation.

La mise en place de la réponse immunitaire implique la migration des cellules immunitaires de la circulation sanguine vers le site inflammatoire où elles pourront exercer pleinement leurs fonctions. Ce processus fait intervenir diverses chimiokines, sélectines et intégrines et se déroule selon plusieurs séquences : la capture des leucocytes, leur roulement puis leur adhésion à l'endothélium. Cette séquence aboutit à la traversée de l'épithélium (diapédèse) par les cellules immunitaires (**Figure 1**).




D'après Weber, C. Nat. Rev. Immunol 2007 (1)

**Figure 1 :** Migration séquentielle des cellules immunitaires de la circulation sanguine vers le site inflammatoire.

L'intéraction de la L-selectine exprimée par les leucocytes avec son ligand situé sur l'endothélium permet la capture et le roulement de la cellule immunitaire (2). L'étape d'attachement des leucocytes à la surface endothéliale résulte de l'intéraction de la protéine VCAM1 $\alpha_4\beta_1$ endothéliale (Very Late Antigen 4) avec l'intégrine ICAM1 $\beta_2$ comme LFA1 (Leukocyte Function-Associated Antigen 1) sur la membrane des leucocytes. Il se produit également un réarrangement du cytosquelette des cellules endothéliales permettant la concentration en une région des protéines d'attachement (3). La diapédèse fait intervenir la liaison de LFA1 avec ICAM1 ainsi que l'intéraction des intégrines exprimées par les leucocytes avec les protéines d'adhésion JAM (Junctionnal

Adhesion Molecules) régulant habituellement les contacts cellules-cellules (4). L'étape de diapédèse requiert également l'expression de chimiokines à la surface de l'endothélium (5).

### 1.1. Les cytokines de l'inflammation

Durant l'inflammation, cytokines et chimiokines sont produites sur le site de l'infection et ont de multiples effets sur l'organisme. Les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF (Tumor Necrosis Factor) et l'IL-1 (Interleukin-1) augmentent localement l'activité microbicide des cellules phagocytiques. Ces cytokines participent à l'initiation de la coagulation (6) et activent la production de protéines vasodilatatrices comme le vascular endothelial growth factor par les cellules endothéliales (7). Elles stimulent également la production des chimiokines IL-8 (CXCL8) et MCP-1 (Monocytes Chemoattractant Protein ou CCL2) par les cellules épithéliales et endothéliales afin d'attirer neutrophiles et macrophages sur le site inflammé (8). De même, l'activation des cellules endothéliales stimule l'expression des molécules d'adhésion à la surface des leucocytes et permet d'initier la diapédèse (9, 10). Ces cytokines peuvent avoir par ailleurs des effets systémiques sur l'organisme. En effet, il a été montré que l'IL-1β augmente la production d'IL-6 dans l'hypothalamus antérieur, zone du cerveau régulant la température de notre corps, provoquant ainsi la fièvre (11).

### 1.2. Le TNF, médiateur de l'inflammation

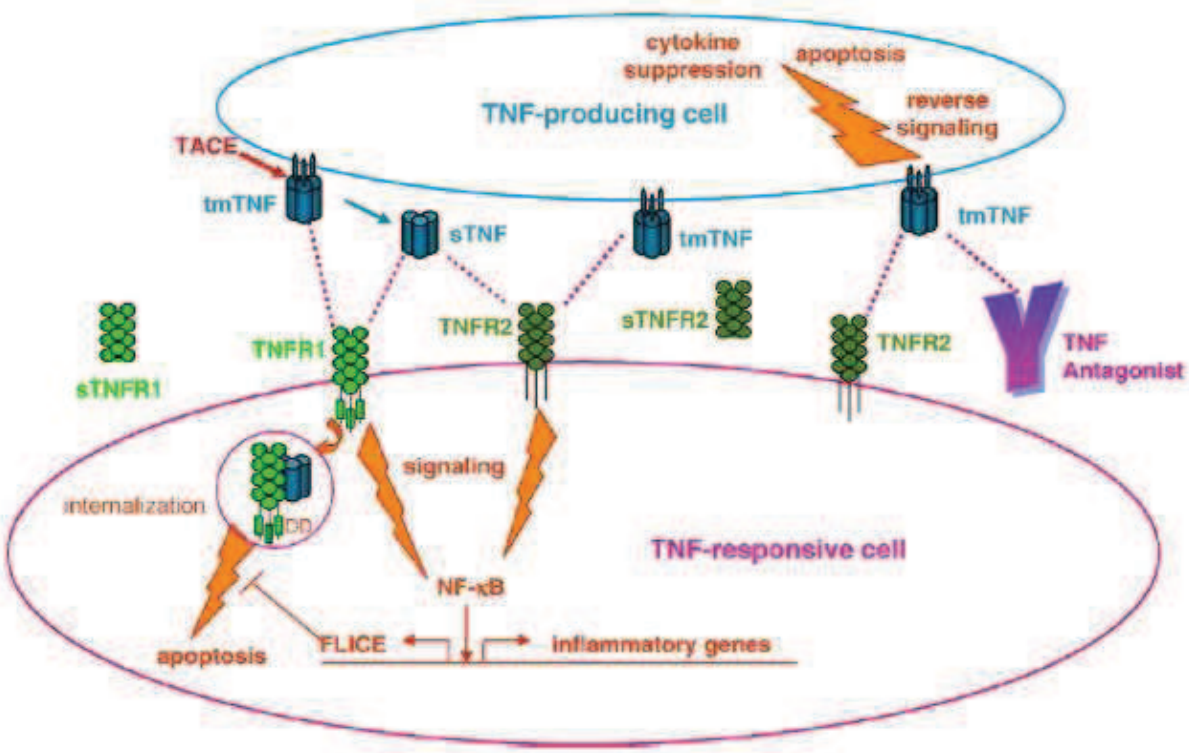
La découverte du TNF est marquée par toute une série d'observations et d'expériences depuis une centaine d'années. En effet, en 1868, Bruns observe que les patients atteints de tumeurs montrent une régression de ces dernières suite à une infection bactérienne (12). Ces observations sont confirmées en 1944 par Shear et col. (13). En 1975, Elizabeth Carswell montre qu'une substance présente dans le sérum de souris infectées par le bacille de Calmette Guérin (BCG) et le LPS permettent d'induire la nécrose de la tumeur et la nomme TNF (14). C'est en 1984 que la séquence d'acides aminés du TNF humain est déterminée et la protéine purifiée à partir d'une lignée cellulaire lymphoblastoïde (15-17). Beutler et col. travaillaient en parallèle sur la cachexine associée aux infections parasitaires permettant l'inhibition de la protéine

lipase (18). De même, l'équipe de Takeda identifiaient le T cell Differentiation-inducing factor (19). Ces deux molécules correspondent en fait au TNF.

D'autres protéines homologues au TNF ont par la suite été découvertes et composent la superfamille du TNF. On distingue actuellement 19 molécules différentes parmi lesquelles on retrouve les lymphotoxines α et β ou encore le ligand FAS (20, 21). Ces 19 ligands initient leur réponse cellulaire grâce à 29 récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF (TNFR) qui se caractérisent par un domaine riche en cystéine (CRD) dans la portion extracellulaire (22).

Le TNF se retrouve dans l'organisme sous deux formes, l'une membranaire (Mem-TNF) et l'autre soluble (sTNF). Le TNF est en premier lieu synthétisé sous la forme d'une protéine transmembranaire de type II de 26kDa. Elle est ensuite clivée par la métalloprotéinase TACE (TNFα Converting Enzyme) en une forme sécrétée de 17kDa (23, 24).

Le TNF est produit par un grand nombre de cellules, immunitaires ou non, telles que les macrophages, les DC, les cellules T et B, les cellules Natural Killer (NK), les fibroblastes ou les neurones (25-27). Le sTNF et le Mem-TNF interagissent via les récepteurs TNFR1 et TNFR2 (TNF Receptor 1 ou p55 et TNF Receptor 2 ou p75) afin d'exercer leurs effets biologiques (28). TNFR1 semble être exprimé de manière constitutive alors que TNFR2 est inductible et préférentiellement exprimé par les cellules endothéliales et hématopoïétiques. Le sTNF et le Mem-TNF peuvent tous deux se lier à ces deux récepteurs mais il semble que la forme soluble se lie préférentiellement au TNFR1 et la forme membranaire plutôt au TNFR2 (29-31). Par ailleurs, TNFR1 et TNFR2 sont également solubles afin d'ihniber l'action du sTNF et Mem-TNF (32) (**Figure 2**).




D'après Tracey, D. Pharmacology and Therapeutics 2008 (32)

**Figure 2 :** Effets biologiques du TNF et intéraction avec ses récepteurs.

Le TNF joue un rôle important dans l'homéostasie du système immunitaire avec notamment le bon développement et la maintenance des organes lymphoïdes (33, 34). Les souris déficientes en TNF ou TNFR1 montrent d'ailleurs une défaillance partielle dans la formation des follicules de cellules B (35).

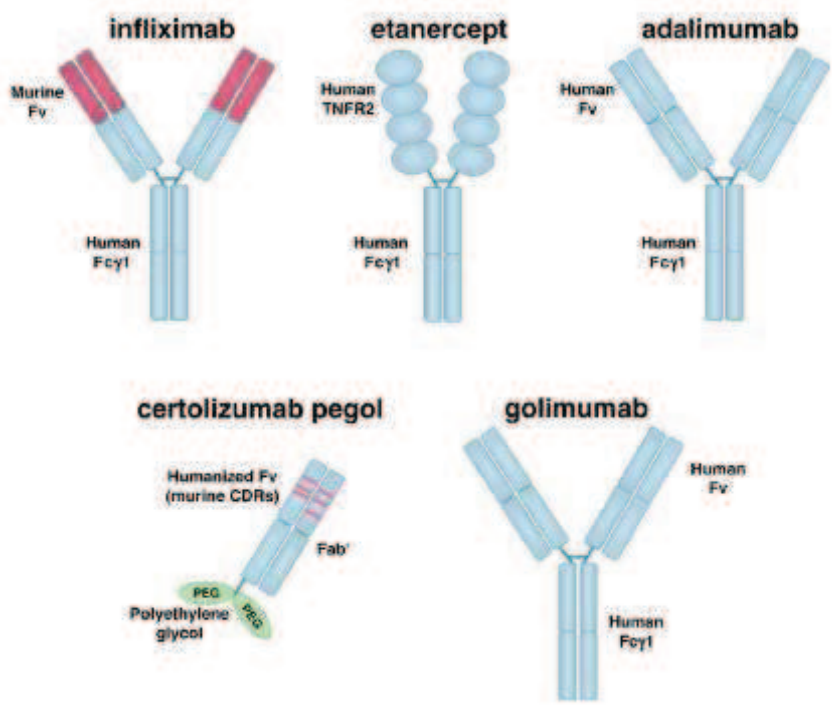
Le TNF permet l'expression de chimiokines nécessaires au recrutement de leucocytes dans les tissus inflammés (36) et permet la formation de granulomes par les macrophages et les cellules T lors d'infections par *Mycobacterium tuberculosis* ou *Listeria monocytogenes* (37, 38). Les études de Grivennikov et col. ont montré que le TNF produit par les macrophages et les neutrophiles, et non par les cellules T et B, est critique dans la résistance à l'infection par Listéria (39). L'équipe de Serbina et col. a également étudié la résistance à l'infection par cette bactérie et a pu mettre en évidence le rôle important du TNF dans l'induction de la synthèse d'oxyde nitrique par les DC spléniques (40).

Beaucoup de ces travaux étudient les effets du TNF sans faire de distinction entre le sTNF et le Mem-TNF. Plusieurs équipes ont cependant montré que le Mem-TNF est impliqué lui aussi dans la cytotoxicité, l'activation des cellules B ou l'induction d'IL-10 par

les monocytes (31, 41, 42). De plus, le Mem-TNF peut induire un rétrosignal grâce à un motif caséine kinase, ce qui supprime la production de cytokines ou induit l'apoptose de la cellule exprimant le Mem-TNF (43, 44)(**Figure 2**).

Les travaux de Allie et col. sur les souris Knock In n'exprimant que le Mem TNF ont permis de montrer que ces animaux résistent partiellement à l'infection par M*ycobacterium tuberculosis* (45, 46). De même, ces souris ont une réponse immunitaire normale après infection par *Leichmania major*, ce qui n'est pas le cas des souris TNF-/- (47). Une partie de ma thèse s'est ainsi attachée à étudier le rôle du Mem-TNF dans l'infection par *Listeria monocytogenes* et il s'avère effectivement que la forme membranaire du TNF permet de garder une immunité partielle contre la Listéria.

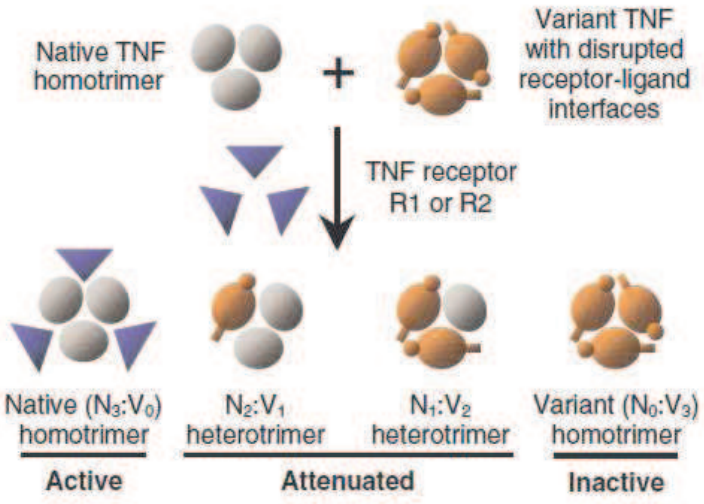
Le TNF agit normalement à faible concentration sur le site de l'inflammation mais il arrive parfois que le système ne soit pas régulé normalement. En effet, une concentration trop importante peut conduire au développement d'une pathologie plus sévère comme l'arthrite rhumatoïde où le TNF devient alors une cible thérapeutique importante (48). Ainsi, les souris transgéniques exprimant des quantités importantes de TNF développent spontanément une arthrite cliniquement et histologiquement similaire à l'arthrite rhumatoïde (49). Le TNF semble donc avoir un rôle important dans la cascade d'évènements conduisant au développement de l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn ou encore le psoriasis. L'effet du TNF est amplifié par l'induction rapide d'autres cytokines comme l'IL-1β ou l'IL-6 (50). Le traitement actuel de ces maladies repose entre autre sur l'administration d'anti-TNF avec l'infliximab, l'etanercept, l'adalimumab, le certolizumab pegol, le golimumab. Tous, sauf l'étanercept qui correspond au TNFR2 fusionné à un frgament Fc d'une IgG1, sont des anticorps dirigés contre le TNF (**Figure 3**). Le Thalidomide constitue quant à lui un autre traitement induisant la dégradation rapide de l'ARN messager et aboutit à l'inhibition de la production de TNF (51, 52).




D'après Tracey, D. Pharmacology and Therapeutics 2008 (32)

**Figure 3 :** Structure des principaux antagonistes du TNF utilisés dans les traitements anti-TNF. Tous sont des anticorps, excepté l'étanercept qui est une protéine de fusion d'une portion de TNFR2 humain avec la partie Fc d'une IgG1 humaine.

Tous ces traitements supprimant les effets du sTNF et Mem-TNF sont efficaces mais ont pour effet d'augmenter les risques de maladies opportunistes comme la listériose ou la tuberculose (53-55). Un anti-TNF d'un nouveau type, le Dominant-Négatif du TNF (DN-TNF), a vu le jour avec comme idée principale d'inhiber seulement la forme soluble du TNF et de garder intègre la forme membranaire afin de conserver une immunité minimale, évitant à l'organisme de contracter d'autres infections. Ce DN-TNF est constitué de trois monomères comportant des mutations clés empêchant la fixation et l'activation des récepteurs TFNR1 et TNFR2 (56, 57). Ces mutations respectent toutefois l'intégrité structurale de la protéine et permet les échanges de monomères avec le sTNF natif (**Figure 4**).




D'après Steed, P.M. Science 2003 (56)

**Figure 4:** Représentation schématique de l'action du DN-TNF. Le TNF natif (en gris) forme un homotrimère se liant à son récepteur contrairement au DN-TNF formant des hétérotrimères ou des homotrimères (en orange) non fonctionnels.

J'ai pu tester ce DN-TNF dans le modèle d'infection par Listéria. Mes expériences m'ont permis de valider mes précédents résultats sur le rôle du TNF membranaire en réponse à ce pathogène et de montrer que le DN-TNF supprime effectivement l'activité du sTNF tout en gardant l'immunité protectrice conférée par le Mem-TNF.

## 2. Le mécanisme de phagocytose

Décrit il y a cent an par Elie Metchnikoff, un embryologiste russe (58), le phénomène de phagocytose est un mécanisme cellulaire essentiel utilisé aussi bien par les organismes unicellulaires que par les cellules appartenant aux métazoaires. Dans un organisme simple comme l'amibe *Dictyostelium discoideum*, les phagocytes détectent les agrégats et ont un rôle dans la défense de l'hôte (59). Chez les organismes supérieurs, l'emprisonnement et la digestion des particules étrangères à l'organisme sont effectués par des cellules professionnelles.

Les particules ciblées par la phagocytose peuvent être des microorganismes ou des cellules altérées appartenant à l'organisme lui-même. En effet, les phénomènes d'embryogenèse ou d'homéostasie tissulaire font intervenir des mécanismes d'apoptose. L'importance du mécanisme de phagocytose durant l'embryogenèse de *Drosophila melanogaster* a ainsi été très étudié (60, 61). De même, chez la souris, les macrophages

exercent un rôle important dans le remodelage tissulaire intervenant durant l'embryogènese et dans l'élimination des cellules mortes (62, 63). Dans bon nombre d'espèces, la phagocytose exerce également un rôle protecteur durant l'invasion par un pathogène et intervient dans la réponse immunitaire innée (64). De plus, les phagocytes interviennent dans la présentation d'antigène, pré-requis au déclenchement de la réponse immunitaire adaptative.

La phagocytose débute en premier lieu par la liaison de l'antigène au récepteur du phagocyte. Ces récepteurs sont nombreux et on retrouve parmi eux les récepteurs scavenger comme CD36 (65, 66) ou SRA (Class-A Scavenger Receptor) (67, 68) intervenant dans la phagocytose des cellules apoptotiques et des pathogènes tels que E. *coli* ou S. *aureus* (69, 70). D'autres études ont montré que le système du complément est un acteur important de la phagocytose (71). Helmy et col. ont ainsi identifié le récepteur CRIγ exprimé par les macrophages résidents du foie, les cellules de Kuppfer, et reconnaissant les fragments C3b et iC3b. Ces récepteurs du complément peuvent également se lier à la Mannose-Binding Lectine (MBL) et les souris déficientes en cette protéine sont sensibles aux infections par S. *aureus* (72).

Une fois que cette liaison est effectuée entre la particule antigénique et le phagocyte, il y a formation de pseudopodes grâce à un réarrangement du cytosquelette d'actine et un remodelage de la membrane (73). Le pathogène se retrouve ainsi emprisonné dans le compartiment intracellulaire nommé phagosome au sein du duquel seront produits plusieurs substances toxiques comme le NO, l'$O_2^-$ ou le $H_2O_2$ (74). Les enzymes iNOS (inductible Nitrique Oxyde Synthase) et la SOD (superoxyde dismutase) sont importantes dans la production de ces composés et contribuent à l'élimination de certains pathogènes (75, 76). Le phagosome subit un phénomène de maturation en interagissant avec les endosomes précoces puis tardifs et les lysosomes. Il acquiert successivement le contenu de chacun pour devenir un phagolysosome (77). Au cours de cette maturation, le contenu du phagosome s'acidifie (78) et contribue ainsi à l'élimination des pathogènes en limitant leur croissance. Cependant, certaines bactéries ont élaboré des stratégies leur permettant d'échapper à leur destruction par le phagolysosome. C'est le cas de M. *tuberculosis* empêchant la maturation du phagosome

(79) et de L. *monocytogenes* qui utilise des phospholipases et la listériolysine afin de lyser la membrane phagosomale (80).

## 3. Les récepteurs Toll-like

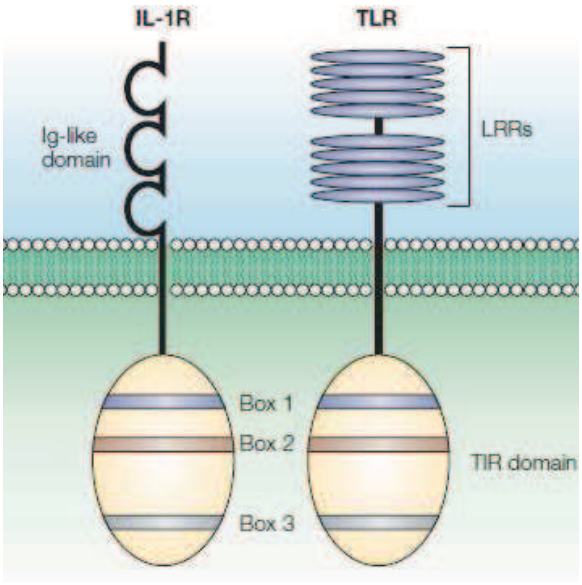
Les cellules immunitaires détectent les motifs microbiens à la surface membranaire des pathogènes. Les récepteurs Toll-like constituent une famille de récepteurs impliqués dans cette reconnaissance et donc dans la mise en place d'une réponse immunitaire innée.

### 3.1. La découverte des TLR

La découverte de la famille TLR a débuté avec l'identification du récepteur Toll exprimé chez les insectes. Il a ainsi été établit que Toll permet l'établissement de l'axe dorsoventral durant l'embryogenèse (81). Son étude a conduit quelques années plus tard à découvrir qu'il intervient également dans la réponse immunitaire innée antifongique des drosophiles (82). Les recherches menées par la suite par Medzhitov et Janeway ont permis d'établir que TLR4 est un homologue humain et murin du gène Toll de la drosophile activant la voie de signalisation de l'IL-1, qui est fortement impliquée dans la réponse inflammatoire (83). Depuis cette découverte, 13 TLR murins et 10 TLR humains ont été identifiés (84).

### 3.2. La structure des TLR

Les TLR sont des glycoprotéines membranaires de type I caractérisées par un domaine extracellulaire comportant de nombreux motifs riches en Leucine (LRR) et par une région cytoplasmique nommée « domaine TIR » en raison de sa forte homologie au récepteur de l'IL-1 (IL-1R) (85). Chacune de ces deux régions a un rôle bien spécifique. La partie intracellulaire relativement conservée est cruciale pour activer différentes voies de signalisation faisant intervenir les protéines adaptatrices MyD88 (Myeloid Differenciation Factor), TIRAP/Mal (TIR domain-containing Adaptor Protein / MyD88-adaptor like) ou TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFNβ). La partie extracellulaire donne quant à elle la spécificité de reconnaissance du récepteur grâce à ses différents domaines LRR (**Figure 5**).




D'après Akira S. Nat. Rev. Immu., 2004 (86)

**Figure 5** : Structure des TLR et du récepteurs IL-1R.
Les récepteurs TLR et IL-1R ont un domaine cytoplasmique conservé appelé TIR et caractérisé par l'existence de trois régions homologues nommées box 1, 2 et 3. Les parties extracellulaires sont très différentes : l'IL-1R comporte 3 domaines de type immunoglobuline alors que les TLR possèdent des répétitions en tandem de régions riches en leucine (LRR).

### 3.3. Les TLR et leurs ligands

Les TLR agissent en homodimères ou hétérodimères pour reconnaitre leurs ligands. Il a ainsi été établi que TLR1, TLR2 et TLR6 reconnaissent les lipides ainsi que les composés carbohydratés de la paroi des bactéries Gram-positive. Plus particulièrement, TLR2 se lie aux peptidoglycanes (PGN), à l'acide lipoteichoique (LTA) ainsi qu'aux lipopeptides diacylés lorsqu'il est associé au TLR6 (87, 88). L'hétérodimère TLR2-TLR1 reconnait les lipopeptides triacylés des bactéries et mycobactéries (89). TLR2 illustre bien le fait qu'un TLR peut donc reconnaitre un large éventail de pathogènes puisqu'il est impliqué dans la réponse inflammatoire contre *Staphylococcus aureus* (90), *Streptococcus pneumoniae* (91), *Listeria monocytogenes* (92) ou encore contre *Candida albicans* (93).

TLR4 reconnait quant à lui le LPS de la paroi des bactéries Gram-négative et fait intervenir pour cela des protéines autres que les TLR afin d'amplifier la réponse immunitaire. En effet, le LPS vient se lier à la protéine cytosolique LBP (LPS Binding Protein) chargée d'apporter ce dernier au co-récepteur CD14. Le complexe CD14-LPS

est reconnu par la protéine MD-2 associée à l'homodimère TLR4 afin de mettre en place une réponse innée (94, 95) (96).

TLR5 est spécialisé dans la détection des bactéries flagellées puisqu'il reconnait un domaine très conservé de la flagelline, un constituant majeur du flagelle de ces pathogènes (97, 98). Il semble que TLR5 soit plutôt exprimé du coté basolatéral et non au pôle apical des cellules épithéliales (99). On le retrouve également sur les cellules endothéliales de l'intestin (100). La flagelline est également détectée dans les poumons et active la production de cytokines par les cellules épithéliales pulmonaires (101). Le TLR5 joue ainsi un rôle important au niveau des muqueuses intestinales ou pulmonaires. L'existence d'un codon stop dans le domaine de liaison du TLR5 humain à la flagelline empêche la transmission du signal et ce polymorphisme est associé à une susceptibilité accrue des personnes aux pneumonies causées par L. *pneumoniae* (101).

TLR11 est impliqué dans la reconnaissance de la profiline issue du parasite *Toxoplasma gondii* (102) et d'un composant encore inconnu des bactéries uropathogéniques (103).

Les TLR3, 7, 8 et 9 sont les récepteurs d'acides nucléiques et de leurs dérivés. TLR3 se lie à l'ARN double brin produit notamment lors de la réplication des virus et à son ligand synthétique Poly I :C (Polyinosine-deoxycytidylic acid) (104); TLR7 et 8 reconnaissent l'ARN simple brin et TLR9 l'ADN viral (105, 106).

### 3.4. Les voies de signalisation induites par l'activation des TLR

La liaison du ligand à son TLR induit un changement de conformation du récepteur qui va alors se lier à une protéine adaptatrice grâce à son domaine TIR intracellulaire. Ce mécanisme conduit à une cascade de signalisation permettant l'activation de gènes intervenants dans les mécanismes de défense de l'hôte contre le pathogène.

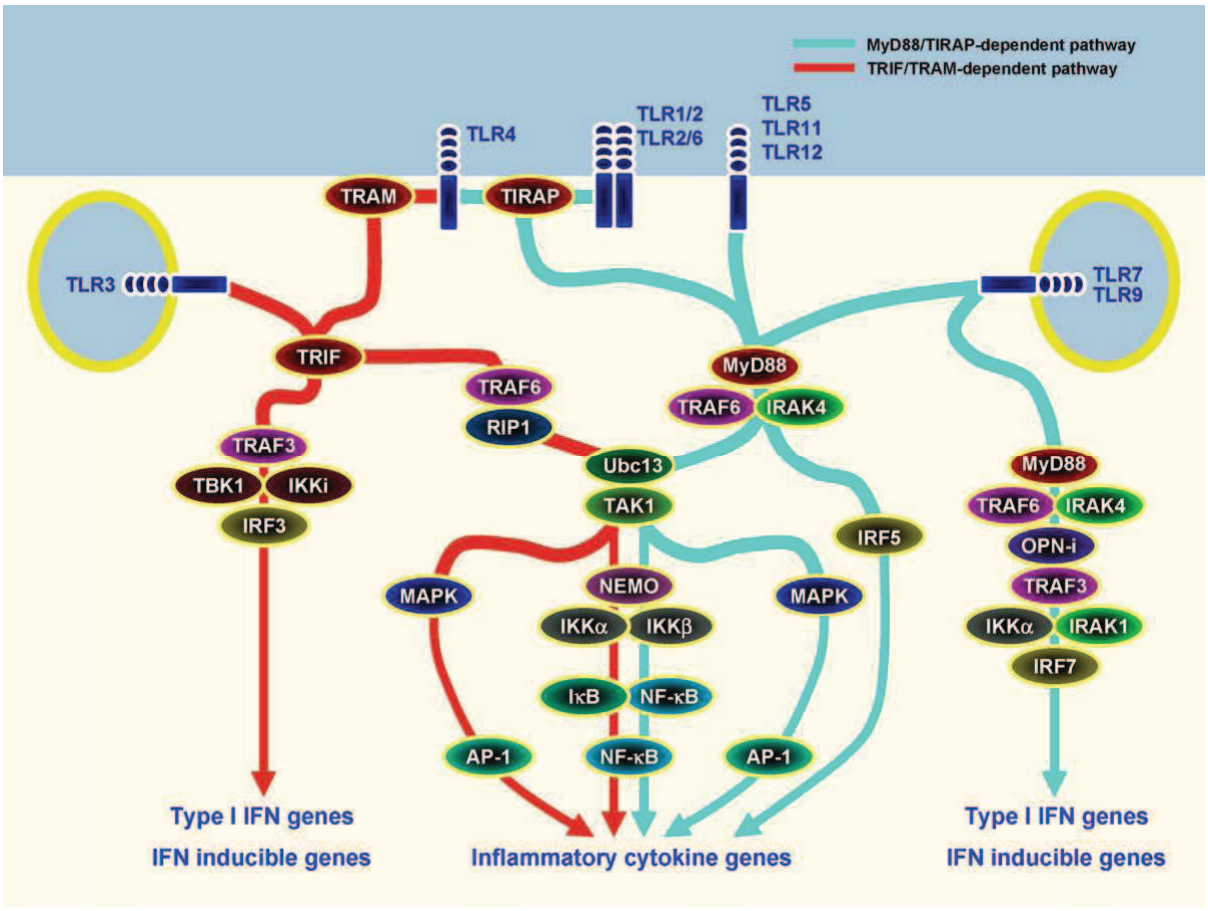
Il existe à ce jour quatre molécules adaptatrices : MyD88, TIRAP, TRIF et enfin TRAM/TICAM2 (TRIF-related adaptor molecule/TIR-domain adaptor molecule 2). Ainsi, un même récepteur peut initier différentes réponses suivant la protéine adaptatrice qui lui est associée et deux voies ont pu être décrites. L'une de ces voies est Myd88-dépendante et conduit à la synthèse de cytokines inflammatoires ; l'autre voie

est TRIF-dépendante et est plutôt impliquée dans la production des IFN inductibles (**Figure 6**).

MyD88 s'associe à tous les TLR sauf au TLR3. L'association de MyD88 avec la partie cytoplasmique du TLR ou de IL-1R induit le recrutement des protéines IRAK1 (IL-1R-associated kinase) et IRAK4 via des intéractions homophiliques dites DD-DD pour Death Domain (107, 108). La formation de ce complexe permet le recrutement de TRAF6 (TNFR-associated factor 6) qui agit comme une ligase intervenant dans les processus d'ubiquitination. En association avec le complexe enzymatique E2 composé de UBC13 et UEV1A, TRAF6 catalyse la polyubiquitination sur lui-même et sur NEMO (IKK-γ/NF-κB essential modulator) (109). Ce mécanisme induit l'activation des kinases TAK1, TAB1 (TAK1-binding protein 1), TAB2 et TAB3 (110, 111), permettant la phosphorylation de NEMO et l'activation du complexe IKK. La phosphorylation de IκB permet de libérer dans le cytoplasme le facteur de transcription NF-κB et de transloquer dans le noyau de la cellule afin d'induire l'activation des gènes permettant notamment la synthèse de cytokines inflammatoires (112).

La **Figure 6** montre par ailleurs l'intervention du facteur de transcription IRF5 (Interferon-regulatory factor 5) en plus de celle de NF-κB. Après activation du TLR, IRF5 transloque dans le noyau pour se fixer au niveau du promoteur de cytokines pro-inflammatoires et permettre la synthèse d'IL-6, IL-12 et du TNF (113, 114).

La signalisation de TLR2 et TLR4 requiert par ailleurs la présence de TIRAP pour recruter MyD88 (115, 116). L'administration de LPS à des souris TIRAP-déficientes n'induit pas de production de cytokines inflammatoires. En revanche, l'expression des gènes IFN-inductibles se produit toujours, montrant ainsi l'existence d'une voie de signalisation MyD88-indépendante (117). TIRAP est donc nécessaire à la signalisation MyD88-dépendante des récepteurs TLR2 et TLR4.




D'après Kawai T. Seminars in Immunology, 2007 (118)

**Figure 6** : Voies de signalisation MyD88/TIRAP-dependant et TRIF/TRAM-dependant.
Après stimulation, tous les TLR, sauf TLR3, recrutent les protéines MyD88, IRAKs et TRAF6. Le complexe TAK1 active le complexe IKK afin de phosphoryler la sous-unité IκB. NFκ-B est alors libéré dans le cytoplasme puis transloqué dans le noyau pour activer les gènes responsables de la production de cytokines inflammatoires.

La stimulation des TLR tels que TLR3, TLR4, TLR7 et TLR9 induit la production d'IFN de type I en plus de celle des cytokines pro-inflammatoires. En réponse à des ligands de TLR3 et TLR4, les souris déficientes en TRIF montrent une incapacité à activer le facteur de transcription IRF3 responsable de l'expression des gènes IFN inductibles permettant la maturation des cellules dendritiques, l'expression de molécules de costimulation et la sécrétion d'IFN-β (119). Yamamoto et col. ainsi que Hoebe ont démontré que TLR4 requiert les voies MyD88-dépendant et MyD88-indépendant/TRIF-dépendant pour induire l'expression des cytokines inflammatoires (120) (121).

D'autres travaux ont montré que TRIF peut s'associer avec une autre molécule adaptatrice nommée TRAM dans la voie TLR4 uniquement (**Figure 6**). En effet, l'inhibition de l'expression de TRAM par siRNA (small interfering RNA) démontre que

cette protéine intervient après activation de la voie TLR4 (et non de la voie TLR3) dans l'induction de l'IFN-β et des gènes IFN-inductibles (122). Yamamoto et col. ont observé que les souris déficientes en TRAM présentent une perte d'activation du facteur de transcription IRF3 ainsi qu'une diminution de l'expression des gènes IFN-inductibles dans le cas d'une stimulation TLR4 (123). TRAM est donc impliqué dans la voie d'activation MyD88-indépendante/TRIF-dépendant de TLR4 (124).

### 3.5. La localisation cellulaire des TLR

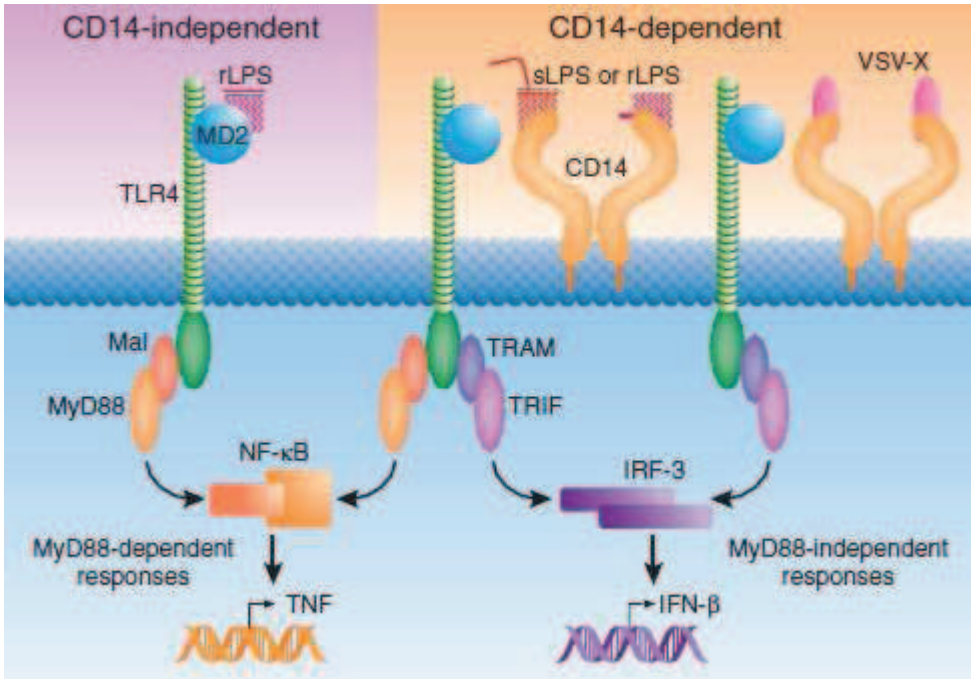
Les TLR sont exprimés par les cellules immunitaires comme les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes B et certains types de lymphocytes T. Les cellules non immunitaires comme les cellules épithéliales ou les fibroblastes peuvent également exprimer les TLR. Cette expression peut être modulée rapidement en réponse aux pathogènes ou selon un certain environnement cytokinique. La spécificité de reconnaissance des ligands par leur récepteur TLR est renforcée par la localisation cellulaire de ces derniers. En effet, les TLR1, 2 et 4 sont situés à la surface cellulaire alors que les TLR3, 7 et 9, impliqués dans la reconnaissance d'acides nucléiques, sont exclusivement exprimés dans les compartiments intracellulaires (125-127). Latz et col. ont ainsi montré que TLR9 est exprimé dans le réticulum endoplasmique (RE) et la stimulation avec son ligand CpG-ADN requiert son recrutement au niveau des compartiments endosomal et lysosomal (128).

### 3.6. CD14 est un des co-récepteurs associés aux TLR

Certains TLR requièrent l'aide de molécules « accessoires » afin d'optimiser la reconnaissance des motifs pathogéniques. Ces molécules peuvent réguler cette reconnaissance à la surface membranaire, comme MD-2, ou dans le réticulum endoplasmique, comme la gp96. Certaines de ces molécules accessoires comme CD14 ou CD36 agissent directement sur les ligands des TLR.

CD14 est une protéine attachée à la membrane plasmique grâce à une ancre glycophosphatidylinositol (GPI) et est active dans sa forme soluble et membranaire (129, 130). CD14 ne possède pas de domaine intracellulaire lui permettant de

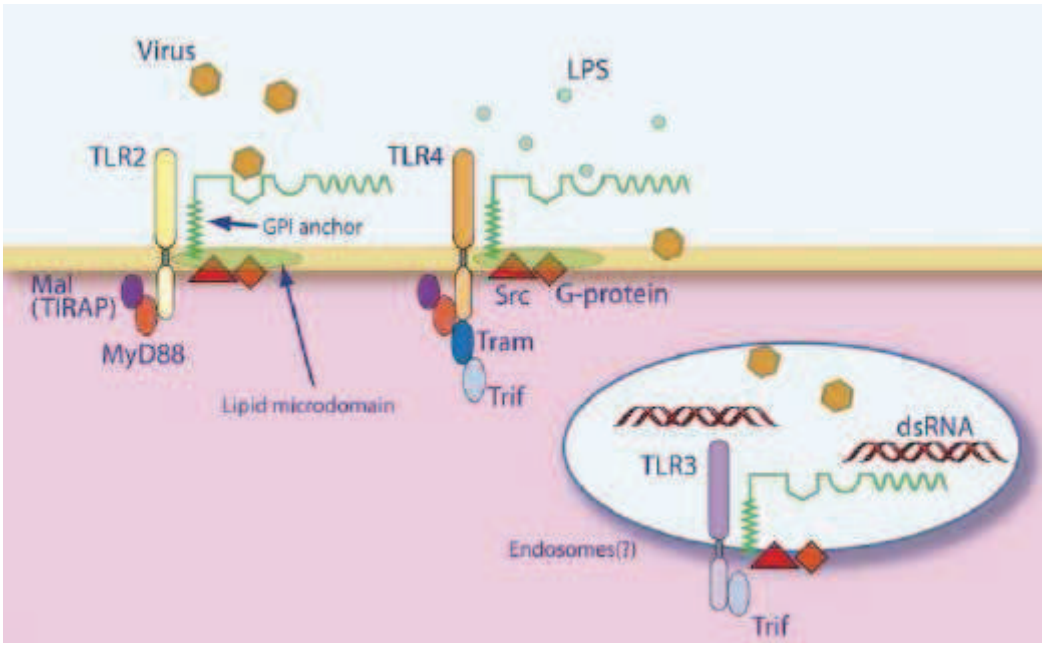
transmettre l'information et nécessite son intéraction avec un TLR pour activer les cellules immunitaires. Les premières études menées sur le CD14 ont montré que cette protéine est impliquée dans la liaison et le transfert de LPS au complexe TLR4/MD-2 (131). Le LPS est constitué entre autre du Lipid A avec une chaine polysaccharidique O-glycosylée plus ou moins longue. Lorsque cette chaine est courte, on parle de « rough LPS ». Ce dernier est capable d'activer seul le TLR4 avec pour conséquence le recrutement des protéines MyD88 et TIRAP, au contraire du « smooth LPS », qui requiert le CD14 pour activer le TLR4 et recruter les adaptateurs TRIF et TRAM (132) (**Figure 7**).




D'après Godowski, P.J. Nat. Immunol. 2008 (133)

**Figure 7** : Voies CD14-dépendante et indépendante impliquées dans la signalisation TLR4/LPS. Le complexe MD2/TLR4 ne peut lier le smooth LPS que si CD14 est présent.

L'utilisation de la coimmunoprécipitation a permis de mettre en évidence l'intéraction directe de CD14 avec les TLR2 et TLR4 (134). Ce complexe ligand/CD14/TLR est dynamique puisque la fixation du ligand sur son récepteur TLR approprié stabilise l'ensemble CD14/TLR et lui permet de migrer au niveau des rafts lipidiques (134). Les travaux de Lentschat ont d'ailleurs révélé que le CD14 membranaire réside dans des microdomaines riches en cholestérol contenant les kinases src et les protéines G importantes dans la réponse au LPS (135) (**Figure 8**).




D'après Finberg, R. Immunity 2006 (136)

**Figure 8 :** Localisation du CD14 au niveau des rafts lipidiques.
Le CD14 est exprimé à la surface membranaire grâce à son encre GPI au niveau de rafts lipidiques regroupant la protéine kinase src et la protéine G.

Aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, le corécepteur CD14 semble important dans la détection de pathogènes reconnus par TLR2. Ainsi, les peptidoglycannes de la paroi de S.*aureus* et S. *pneumoniae* nécessitent la coexpression de CD14 avec TLR2 pour induire une réponse NF-κB (137). CD14 est également impliqué avec TLR2 dans la détection des Streptocoques du groupe B (138) et du cytomégalovirus humain (139), c'est pourquoi j'ai voulu explorer l'implication du CD14 dans la reconnaissance de Listéria *monocytogenes*. Flo et col. ont d'ailleurs montré que CD14 et TLR2 agissaient de concert dans la reconnaissance de la Listéria tuée par la chaleur (Heat Kill *Listeria monocytogenes*, HKLM) (140).

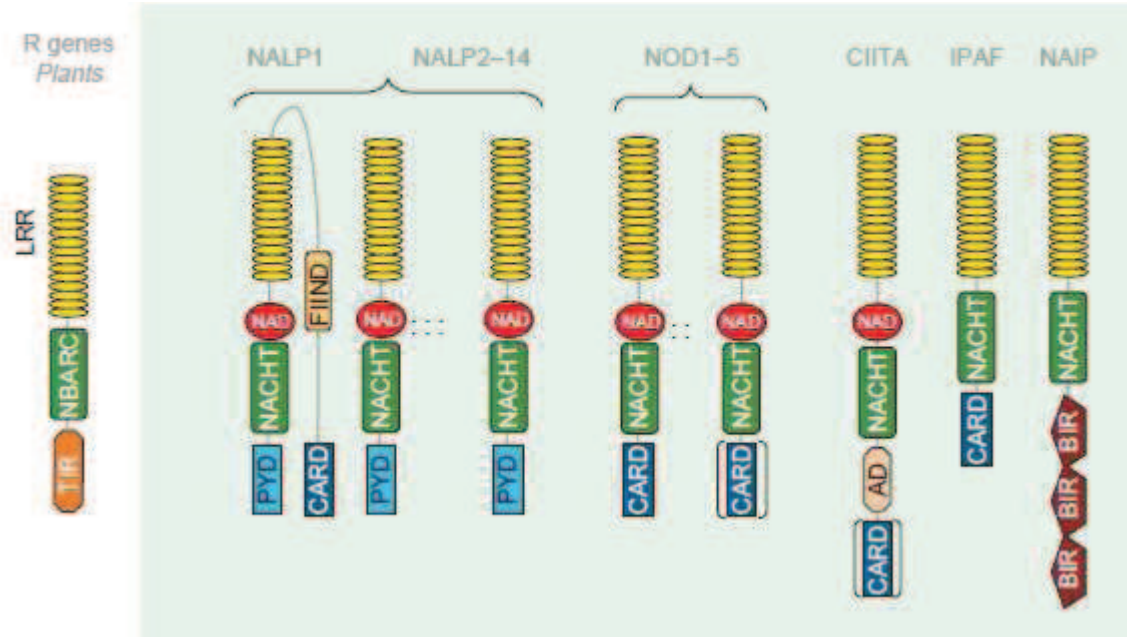
Les travaux de Lee ont depuis mis en évidence le fait que l'activité du CD14 n'est pas restreinte aux TLR4 et TLR2 puisque la transduction du signal initié par TLR3 est amplifiée par ce corécepteur lors de la détection des doubles brins d'ARN (141).

## 4. Les récepteurs NLR et RIG-I : des récepteurs LRR intracytoplasmiques

Deux autres classes de récepteurs cytosoliques intervenant dans la reconnaissance intracellulaires des pathogènes ont été découverts, il s'agit des récepteurs NLR

(Nucleotide binding oligomerization domain (NOD)-like Receptors) et RLH (Retinoic Acid-Inducible gene I (RIG-I)-like Helicases).

Les NLRs sont des récepteurs hautement conservés au cours de l'évolution que l'on retrouve aussi bien chez les mammifères que les plantes (142). Ils se caractérisent par leur structure tripartite puisqu'ils possèdent une partie C-terminale riche en leucine leur permettant de reconnaitre certains motifs pathogéniques ; un domaine central NBD (Nucleotide Binding Domain) présentant une activité ATPase et régulant l'oligomérisation des NLRs ; une partie N-terminale qui peut présenter différents domaines d'un NLR à l'autre. On dénombre par exemple 5 membres NOD (Nucleotide binding Oligomerization Domain) comportant un domaine CARD en N-terminal ; 14 membres NALP ayant un domaine PYRIN ; le NLR NAIP possède 3 domaines BIR (Baculovirus inhibitor of repeat) (**Figure 9**) (143, 144).



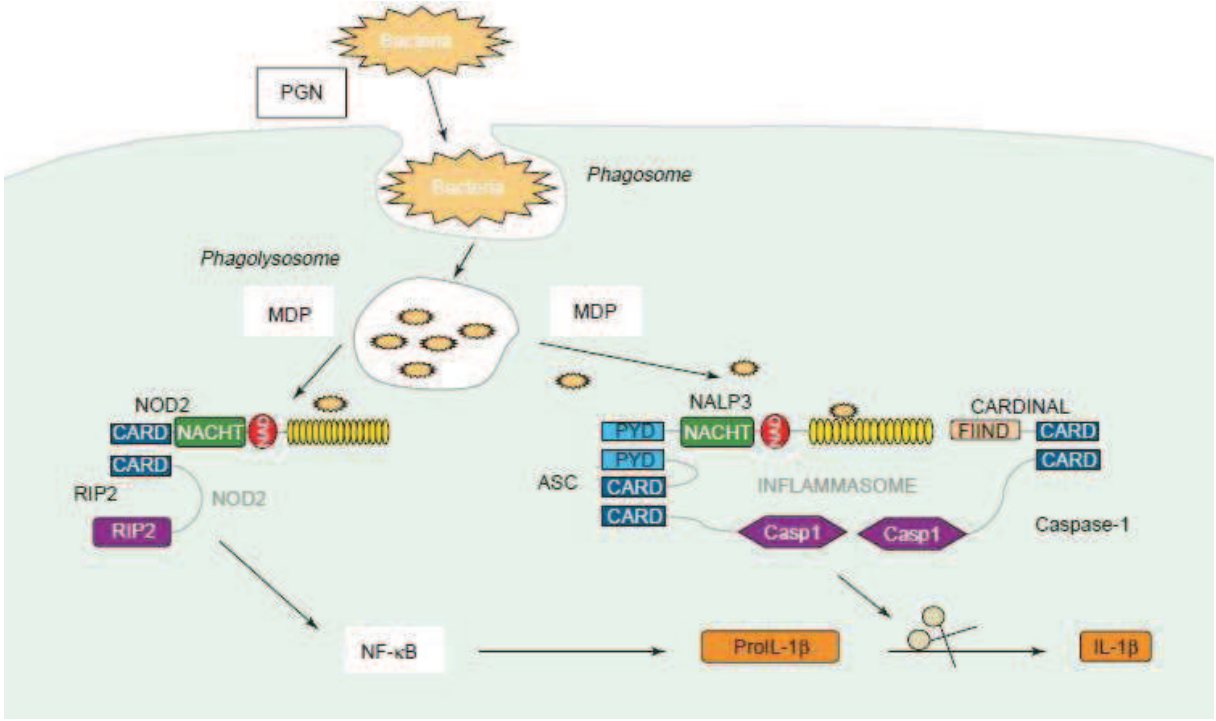

D'après Martinon et Tschopp, Trends in Immunology 2005 (144)

**Figure 9** : Organisation tripartite de quelques NLRs représentatifs.
Les NLRs sont caractérisés par un domaine de reconnaissance de ligands pathogéniques LRRs (en jaune), un domaine NACHT responsable de l'oligomérisation des NLRs (en vert) et un domaine effecteur de type PYD, CARD ou BIR permettant la mise en place d'une signalisation.

Les récepteurs intra-cytoplasmiques NOD1 et NOD2 ont été particulièrement étudiés. Divers travaux ont montré d'une part que les macrophages déficients en NOD1 et NOD2 ne peuvent produire de cytokines pro-inflammatoires en réponse à leurs ligands (145). D'autre part, NOD2 semble impliqué dans les maladies inflammatoires

touchant les intestins, notamment dans la maladie de Crohn. NOD1 et NOD2 reconnaissent respectivement les peptidoglycanes des bactéries que sont l'acide γ-D-glutamyl-meso-diaminopimelique (iE-DAP) et le muramyl dipeptide (MDP) (146, 147). La liaison des ligands à leur NLR permet leur oligomérisation puis l'activation du facteur NF-κB grâce au recrutement de la sérine/thréonine kinase RIP2/RICK sur leur domaine CARD. Cette signalisation aboutit à la production de cytokines pro-inflammatoires et du précurseur de l'IL-1β (pro- IL-1β) (**Figure 10**).

L'infection de l'organisme par les bactéries induit l'activation de la caspase-1, enzyme qui catalyse le processus de maturation de la pro-IL-1 β en IL-1 β fonctionnelle. Ce processus fait appel à la formation d'un complexe catalytique nommé inflammasome regroupant les caspases 1 et 5, ainsi que des membres de la famille NALP et enfin la protéine adaptatrice ASC (Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) (148). Ainsi, NALP et ASC établissent des intéractions homophiliques grâce à leur domaine PYRIN. La caspase-1 vient interagir avec le domaine CARD de la protéine ASC et permet l'activation de l'IL-1β (mais aussi de l'IL-18) (149).

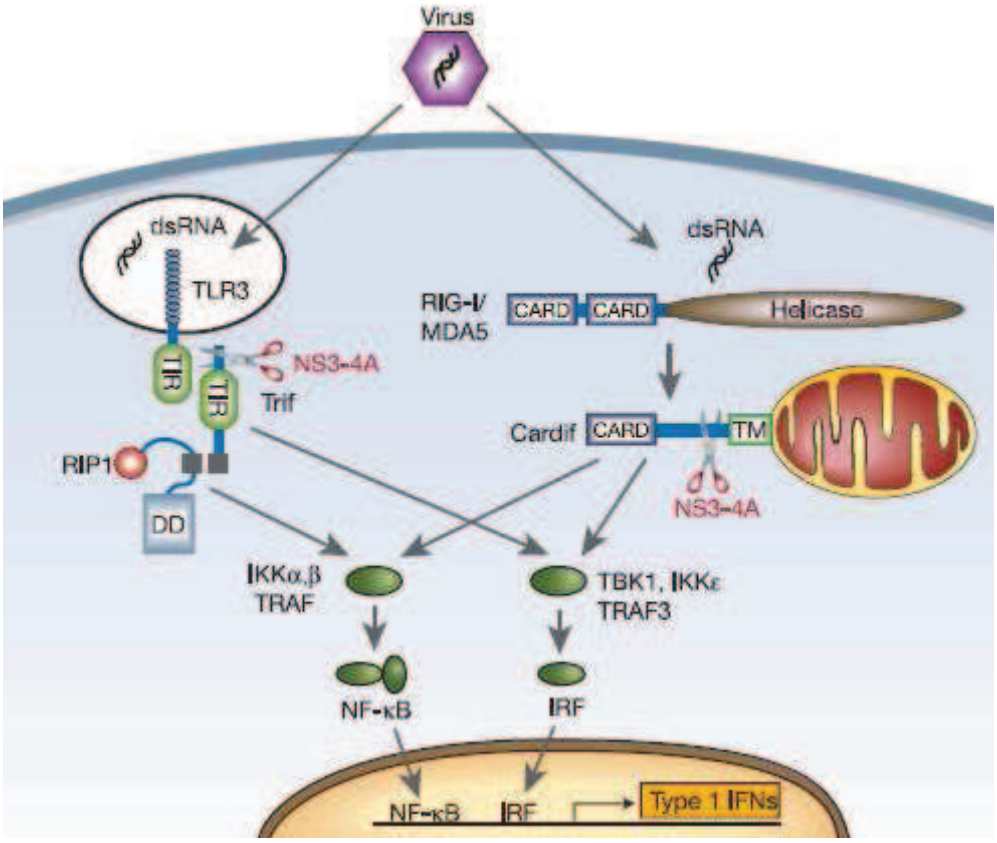



D'après Martinon et Tschopps, Trends in Immunology 2005 (144)

**Figure 10** : Activation de l'inflammasome par les peptidoglycannes (PGN) bactériens.
Les PGN sont dégradés en muramyl dipeptide (MDP) par le phagolysosome. MDP induit l'activation de NOD2 qui conduit à la translocation nucléaire de NF-κB et donc à la production de proIL-1β. MPD conduit également à l'activation de NALP3 afin d'induire la formation de l'inflammasome composé de NALP3, cardinal, ASC et de la caspase-1. La caspase-1 clive la proIL-1β en IL-1β.

Les ligands de la famille NALP sont inconnus, sauf pour NALP3 qui reconnait l'ARN bactérien (150), l'ATP et les cristaux d'acides uriques (151, 152).
Il semble par ailleurs que les NLRs Ipaf (ICE protease activating factor) et NAIP5 (NLR family apoptosis inhibitory protein 5) soient impliqués dans l'activation de la caspase-1 après reconnaissance de la flagelline portée par S. *typhimurium* ou L. *pneumophila* (149, 153).

Les récepteurs RLHs détectent quant à eux les ARN viraux double brins relâchés dans le cytoplasme et non accessibles au TLR3 (**Figure 11**). A ce jour, 3 types de protéines font partie des RLHs : RIG-I et MDA5 (Melanoma Differentiation-Associated gene-5) comportant un domaine CARD dans la partie N-terminale et un domaine helicase en C-terminal. La protéine LGP2 (Laboratory of Genetics and Physiology 2) ne possède que le domaine hélicase en C-terminal (154). Comme les TLR et les NLR, les RLH sont conservés dans l'évolution et sont importants pour la détection des virus. RIG-I reconnait les virus de la maladie de Newcastle ou de Sendai grâce au triphosphate porté dans la partie 5' terminale de leur ARN et permet ainsi la production d'IFN (155, 156). L'ARN double brin des picornavirus tel que le virus de l'encéphalomyocardite, de la rougeole ou de la grippe est reconnu par MDA5 (157-159). La protéine LGP2 fonctionnerait comme un régulateur négatif de la signalisation de RIG-I et MDA-5 (160).




D'après Meylan, E. Nature 2006 (161)

**Figure 11** : Détection de l'ARN double brin viral par TLR3 et les RLH.
Le TLR3 reconnait l'ARN double brin dans les endosomes et recrute l'adaptateur Trif afin d'activer NF-κB et IRF3/7. L'ARN viral peut également être détecté par RIG-1 et MDA5 afin derecruter cardif. Ce mécanisme active également les facteurs de transcription NF-κB et IRF.

## Chapitre 2 : *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* (L.m) est une bactérie opportuniste Gram positive et responsable d'une infection alimentaire, la listériose. Bien que découverte dans les années 1920, ce n'est que dans les années 80 que l'on établit un lien formel entre la maladie et l'ingestion d'aliments contaminés. La listériose constitue un véritable problème de santé publique aussi bien qu'un problème économique. Diagnostiquée principalement dans les pays industrialisés, cette maladie a conduit un bon nombre de pays à instaurer des normes d'hygiène alimentaire sévères ainsi que des systèmes de surveillance de l'infection basés essentiellement sur la centralisation et la caractérisation des souches cliniques de L.*m* dans un laboratoire, le Centre National de Référence des Listéria (CNRL). L'infection par L.m est un modèle très étudié d'intéraction hôte-pathogène puisque cette bactérie élabore diverses stratégies pour franchir les barrières de protection de l'organisme afin de se disséminer à l'intérieur des cellules.

Mes travaux de thèse m'ont permis de m'intéresser à la réponse immunitaire innée contre cette bactérie. J'ai donc étudié l'implication du co-récepteur CD14 ainsi que le rôle du TNF membranaire dans le contrôle de l'infection par L.m.

### 1. Découverte et description de L. *monocytogenes*

Le nom de Listéria a été donné en l'honneur de Joseph Lister, chirurgien britannique des années 1860, inventeur de l'antisepsie dans la chirurgie opératoire. Cependant, la découverte et l'isolement de la bactérie est attribuée à E.G.D. Murray. En effet, c'est en 1926 à Cambridge que la Listéria est officiellement identifiée *Bacterium monocytogenes* comme étant à l'origine d'une septicémie mortelle affectant les lapins et les cochons d'Inde du laboratoire de E.G.D. Murray (162). Les premières cultures de L.*m* ont été effectuées en 1921 par Dumont et Cotoni sur des prélèvements de patients atteints de méningite (163).

L.m est un petit bacille Gram positif (0,4 à 1,5 µm) appartenant au règne des bactéries et à l'embranchement des Firmicutes. Il existe 6 espèces de Listéria : *monocytogenes*, *innocua*, *ivanovii*, *grayi*, *seeligeri*, *welshimeri*. Seules L. *monocytogenes* ainsi que *ivanovii* sont infectieuses pour l'homme.

L.m est une bactérie intracellulaire non sporulée, aérobie et anaérobie facultative mobile entre 10 et 25°C grâce à ses flagelles et que l'on retrouve dans divers milieux comme les eaux (lacs, rivières, eaux d'égouts ou de baies), le sol ou la végétation. L'habitat naturel de cette bactérie semble être les plantes en décomposition. Les animaux domestiques ruminants sont des porteurs asymptomatiques et probablement à l'origine de la maintenance de la Listeria dans l'environnement rural. Cette bactérie très résistante pose des problèmes d'hygiène alimentaire importants du fait de sa capacité à se multiplier dans des fourchettes de température comprises entre -2° et +45°C, sa température optimale étant entre +30 et +39°C. Elle peut également survivre dans des solutions très concentrées en sel ou dans des milieux où le pH s'étend de 4,6 à 9,6 voire plusieurs mois dans la boue (164).

## 2. Manifestations cliniques de la listériose et population à risque

Les infections à L.*m* sont sérieuses puisque mortelles dans 30% des cas mais heureusement rares. La bactérie contamine un certain nombre d'aliments et de nombreuses personnes en ingèrent fréquemment de petites quantités sans qu'aucuns symptômes n'apparaissent. Lorsque les aliments sont fortement contaminés, la listériose peut se manifester sous plusieurs formes.

La période d'incubation est comprise entre 48 heures et 3 mois et la forme la moins grave de la maladie se manifeste chez les personnes en bonne santé par un état grippal, de la fièvre et une gastroentérite (165, 166). Autrefois considérée comme une manifestation silencieuse de la maladie, il apparait aujourd'hui que ces troubles intestinaux soient accompagnés dans 70% des cas par une atteinte de la rate (167, 168). La maladie se résorbe toutefois spontanément en quelques jours chez les personnes immunocompétentes.

En revanche, les manifestations cliniques de la listériose sont beaucoup plus sévères chez les personnes dont le système immunitaire est affaibli comme chez les personnes âgées, les femmes enceintes, les nouveau-nés ou encore les patients atteints du VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) ou de la polyarthrite rhumatoïde du fait de leurs traitements. La période d'incubation chez ces personnes est beaucoup plus longue (10 à 70 jours) ce qui rend difficile l'isolement de la source contaminée.

Les femmes enceintes présentent un système immunitaire affaibli surtout au troisième trimestre de grossesse et constituent un risque potentiel de dissémination de la bactérie chez la mère comme chez le fœtus. En effet, L.m peut infecter le placenta, former des abcès et franchir cette barrière placentaire. Cette listériose materno-foetale est responsable d'avortements ou d'infections néonatales avec un fort taux de mortalité (169, 170). Cette infection généralisée du fœtus appelée granulomatose septique infantile se caractérise par la présence de microabcès disséminés dans le foie, la rate et la peau. La plus forte concentration de L.m se situe dans les intestins ainsi que dans les poumons en raison de l'ingestion de liquide amniotique contaminé. Dans le cas d'une contamination durant l'accouchement, le nouveau-né peut présenter une conjonctivite importante voir une méningite. L.m est d'ailleurs la troisième cause de méningite chez le nouveau-né (171).

En plus de franchir les barrières intestinales et placentaires, L.m peut traverser la barrière hémato-encéphalique pour infecter le système nerveux central (SNC) au niveau des méninges mais également au niveau du parenchyme ce qui témoigne de sa grande capacité à survivre et à se multiplier à l'intérieur des cellules. Deux types différents de dissémination peuvent avoir lieu et conduire à une encéphalite ou à la présence d'abcès dans le parenchyme (172). Cette infection peut se manifester par des mouvements anormaux, des pertes de conscience, une paralysie avec des séquelles neurologiques quand elle n'entraine pas la mort (171).

## 3. Epidémiologie et veille sanitaire

Les premiers cas de Listériose ont été rapportés en 1929 au Danemark (173). Le début des années 1980 marque le début de nombreuses épidémies en Amérique du Nord et en Europe. L'isolement de L.m permet de montrer que la listériose est une infection d'origine alimentaire (174-176). Beaucoup de pays industrialisés, dont la France, ont instauré des normes plus sévères concernant le respect de la chaine du froid, les dates limites de consommation des produits mis sur le marché avec des tests de vieillissement, de croissance bactérienne afin de maîtriser au mieux la contamination des produits par Listéria. La mise en place de cette surveillance a permis de 1987 à 1997 de diminuer de près de 70% les cas de listériose en France (177). La listériose est une maladie à

déclaration obligatoire auprès de l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) depuis 1998 et son évolution se fait essentiellement sous forme de cas sporadiques. En France métropolitaine, le CNRL enregistre un nombre relativement stable de Listériose depuis 1999 avec une diminution de la part relative des formes materno-fœtales (**Figure 12**).

| | | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **France entière** | | 269 | 263 | 188 | 220 | 209 | 236 | 221 | 290 |
| France métropolitaine | | 261 | 257 | 183 | 214 | 202 | 234 | 216 | 277 |
| **Incidence (/1 million d'habitants)** | | 4,5 | 4,4 | 3,1 | 3,6 | 3,4 | 3,9 | 3,6 | 4,7 |
| **Forme** | non Materno-néonatale | 202 | 199 | 144 | 165 | 162 | 187 | 182 | 254 |
| | Materno-néonatale | 67 | 64 | 44 | 55 | 47 | 49 | 39 | 36 |
| **Mortalité** | décès adulte | 47 | 34 | 46 | 35 | 26 | 38 | 31 | 56 |
| | mortalité néonatale et fœtale | 19 | 23 | 13 | 22 | 13 | 16 | 11 | 11 |
| **Forme non Materno-néonatale** | | | | | | | | | |
| Sexe | féminin | 78 | 74 | 55 | 70 | 73 | 77 | 77 | 115 |
| | masculin | 124 | 125 | 89 | 95 | 89 | 110 | 105 | 139 |

**Figure 12 :** Cas déclarés de Listériose en France par la déclaration obligatoire de 1999 à 2006 (d'après l'InVS)

Le Laboratoire des Listéria de l'Institut Pasteur a été désigné CNR par la Direction Générale de la Santé (Ministère de l'Emploi et de la Solidarité) pour assurer la surveillance microbiologique des infections à Listéria en France. Cette surveillance, basée sur la caractérisation des souches isolées des patients, a pour objectif principal la détection des cas groupés et des épidémies.

## 4. Traitements

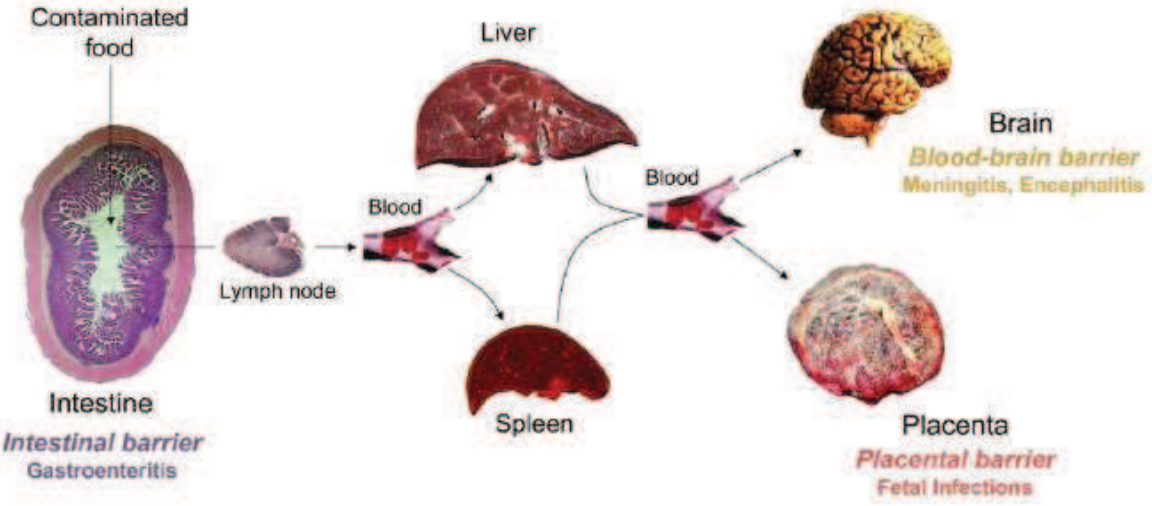
L. *monocytogenes* est une bactérie sensible aux antibiotiques tels que les pénicillines, les aminosides (gentamicine) ou encore les tétracyclines. L'amoxicilline et la gentamicine constituent actuellement le traitement de référence des listérioses. Le CNRL étudie chaque année depuis 1992 la sensibilité des souches cliniques aux antibiotiques utilisés en clinique. Il apparait que L. *monocytogenes* est rarement résistante aux antibiotiques. Cependant quelques études mettent en évidence une augmentation du taux de résistance à un ou plusieurs antibiotiques incluant l'ampicilline parmi les souches isolées de l'environnement et plus rarement parmi les souches isolées

de patients (selon le Rapport annuel d'activité du Centre National de Référence des Listéria).

Aucun vaccin n'a pour l'heure été mis au point contre la Listéria.

## 5. Mode d'infection au niveau des organes

La contamination par L.m se fait par l'ingestion d'aliments fortement contaminés et la dissémination de la bactérie repose sur sa capacité à franchir les trois barrières physiologiques que sont la barrière intestinale, placentaire et hémato-encéphalique (**Figure 13**). Cette bactérie résiste par ailleurs à la mort intracellulaire après phagocytose par les macrophages et peut coloniser des cellules non phagocytiques.




D'après M. Lecuit, 2007 (178)

**Figure 13** : Etapes successives de la dissémination de L.*m* dans l'organisme

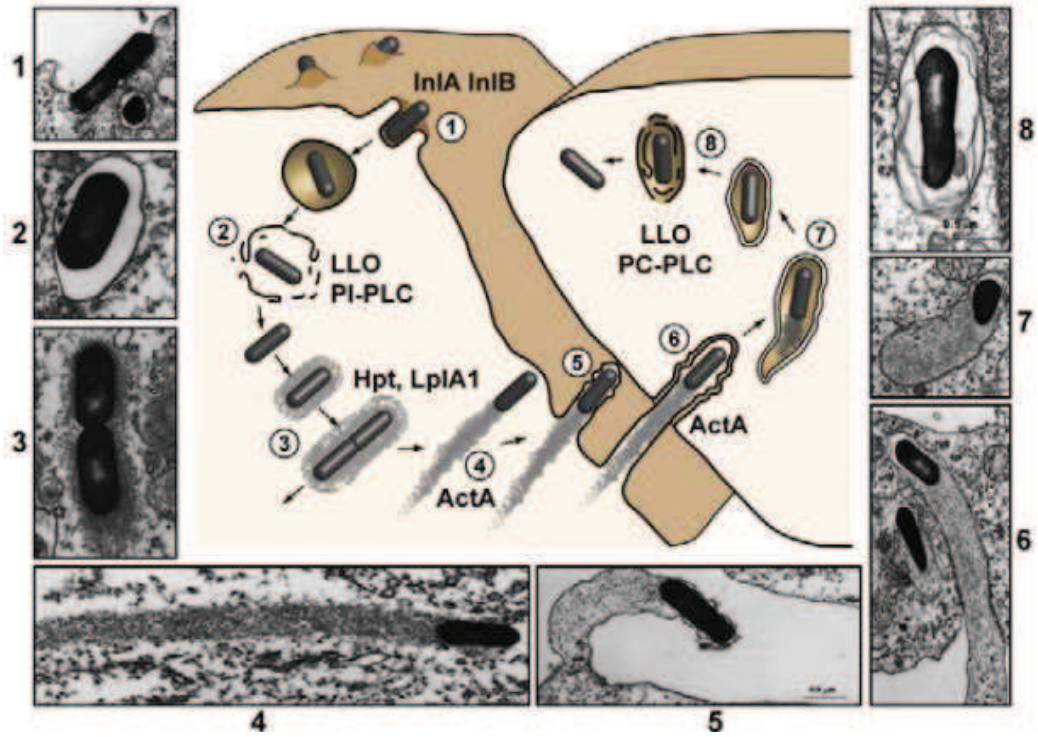
Il existe toujours une controverse concernant le point d'entrée de la bactérie au niveau intestinal. Cette entrée pourrait se faire par colonisation de l'épithélium intestinal (179) mais il semble que les plaques de Peyer soient le site privilégié de réplication de la Listéria (180, 181). Les bactéries prolifèrent et se disséminent dans la *lamina propria* grâce aux cellules dendritiques et aux macrophages et sont véhiculées dans les ganglions lymphatiques avant de passer dans la circulation sanguine (182, 183). L.m infecte alors principalement le foie et la rate. Les macrophages résidents du foie (les cellules de Kuppfer) et ceux de la rate vont en quelques heures phagocyter et tuer les bactéries (184, 185). Chez les personnes immunocompétentes, l'infection se limite à cette première phase dite entérique généralement asymptomatique ou se manifeste par

un état grippal. On observe en revanche une prolifération intense des bactéries dans les hépatocytes chez les personnes dont le système immunitaire est affaibli (186, 187). Cette multiplication importante de L.m conduit à sa libération dans la circulation sanguine pour atteindre le SNC ou la barrière placentaire.

## 6. Dissémination intracellulaire

L.*m* est l'une des bactéries les plus étudiées sur le plan des relations hôte-pathogène en raison de sa capacité à envahir une large variété de cellules. Elle peut être phagocytée par les macrophages ou les cellules dendritiques (188, 189). Ce processus requiert l'intervention du complément C3 qui va se déposer sur les peptidoglycannes de la paroi bactérienne. L'intéraction de C3 avec son récepteur cellulaire CR3 induit l'entrée de la bactérie dans la cellule phagocytaire (190).

La Listéria peut également infecter les cellules non phagocytaires comme les hépatocytes, les fibroblastes, les entérocytes ou les cellules endothéliales (191, 192). L'internalisation de la bactérie dans ces types de cellules résulte d'une intéraction progressive de ligands bactériens que sont les Internaline A et B (InLl A et B) avec leurs récepteurs cellulaires (**Figure 14**). Une fois entrée dans la cellule une vacuole se forme afin de contenir la bactérie. La production d'une protéine induisant la formation de pores membranaires, la listériolysine–O (LLO) ainsi que la synthèse de phosphatidylinositol phospholipase C (PlcA et PlcB) permettent à la bactérie de s'échapper de cette vacuole en 30 minutes environ. Les bactéries se retrouvent alors dans le milieu intracellulaire où elles peuvent se multiplier et recruter l'actine dont elles ont besoin pour se déplacer. L.*m* induit une polymérisation de cette protéine, processus lui permettant de produire de l'énergie pour se propulser à une vitesse de 10µm/minute. Afin de contaminer les autres cellules, la bactérie va former une protusion membranaire jusqu'au cytoplasme de la cellule voisine où une vacuole à deux membranes se forme. La bactérie s'en échappe à nouveau et recommence un cycle de prolifération (193-195).



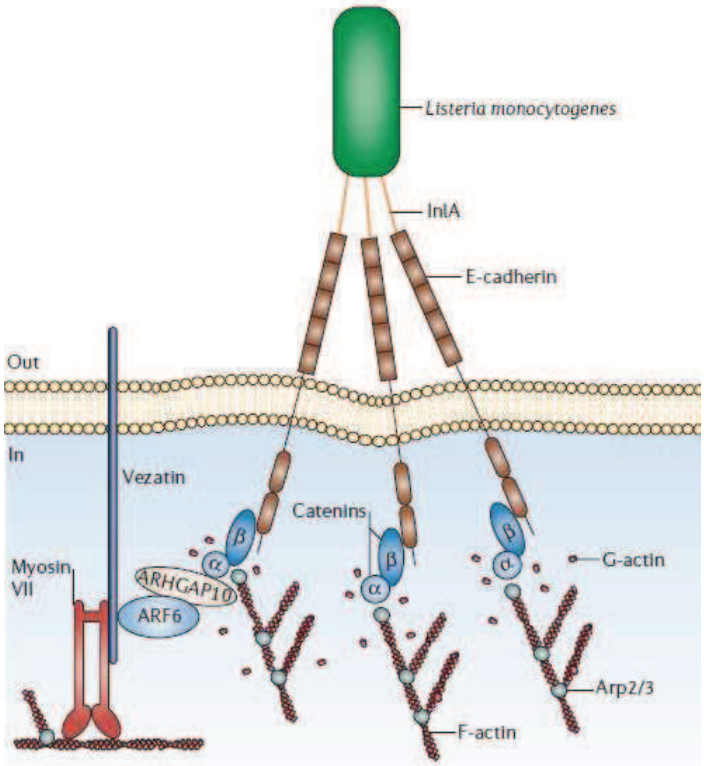

D'après Cossart, P. 2008 (196)

**Figure 14** : Etapes successives d'internalisation et de dissémination intracellulaire de L.m ActA, Actine A ; Hpt, Hexose Phosphate transporter ; LLO, Lystériolysine ; LplA1, Lipoate Protein Ligase ; PI-PLC, Phosphatidylinositol-Phospholipase

L'internalisation de L.m fait intervenir les protéines de surface Internaline (Inl) A et B (197, 198). InlA permet l'entrée de Listéria dans les cellules épithéliales et InlB dans les hépatocytes. De plus, Disson et col. ont utilisé comme modèle d'étude la gerbille ainsi qu'une nouvelle souris Knock In pour le recepteur à l'InA afin d'étudier plus précisément le rôle de ces deux internalines dans la listériose fétoplacentaire (199).

Les récepteurs de ces deux protéines ont rapidement été identifiés. Listéria est ainsi le seul pathogène connu jusqu'à présent utilisant le récepteur E-cadhérine capable de reconnaitre InlA. Identifié par chromatographie d'affinité, le récepteur E-cadhérine est une glycoprotéine transmembranaire comprenant cinq domaines cadhérine extracellulaires et un domaine intracytoplasmique. Il régule l'intéraction cellule-cellule selon un procédé calcium-dépendant et joue donc un rôle très important dans la cohésion des tissus et le maintien de jonctions adhérentes (200, 201). La Listéria détourne la fonction première du récepteur E-cadhérine en mimant le processus de formation des jonctions adhérentes. L'intéraction entre le récepteur et InlA induit le recrutement des

caténines α et β ainsi que du complexe Arp2/3 jouant un rôle dans la mobilité actine-dépendante de la bactérie (202, 203) (**Figure 15**).

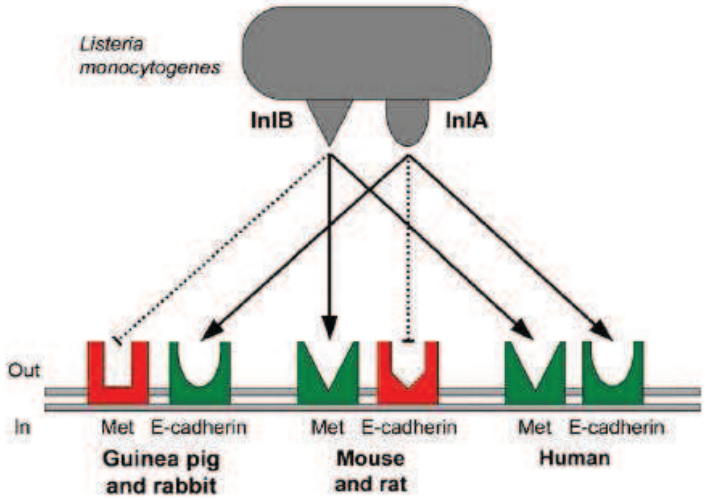



D'après Hamon, M. 2006 (204)

**Figure 15** : Internalisation de L.m par une cellule non phagocytique. Ce mécanisme requiert la reconnaissance de l'Internaline A par son récepteur E-cadhérine et induit un réarrangement du cytosquelette. ARF6, ADP-ribosylation factor 6 ; ARHGAP10, Rho GTPase-activating protein 10 ; Arp, actin-related protein ; F-actin, filamentous actin ; G-actin, globular actin.

L'étude des souches de L.*m* mutantes pour InlA dans le modèle murin a suscité quelques questions. En effet, les souris infectées avec une Listéria sauvage ou déficiente en InlA ont un même phénotype. Il s'avère en fait que le récepteur E-cadhérine humain porte une proline en position 16 alors que le récepteur murin porte un acide glutamique, ce qui empêche la reconnaissance de InlA par ce récepteur (205) (**Figure 16**). Beaucoup d'études ont ainsi été réalisées en inoculant la Listéria directement par voie veineuse pour « court-circuiter » la première étape d'infection au niveau intestinale. Afin de palier à cette déficience, des souris transgéniques portant le récepteur E-cadhérine humain sur les entérocytes ont été générées et il a ainsi été démontré que l'intéraction entre InlA et E-cadhérine est nécessaire à l'entrée de Listéria dans les cellules intestinales lorsque la bactérie est administrée oralement (205). Schubert *et al.* ont par ailleurs modifié la souche sauvage de L.*m* EGD (Lmo-EGD)

en substituant certains acides aminés de l'InlA afin de la stabiliser sur le récepteur (206). Ceci permet donc d'améliorer nos connaissances sur la listériose en élargissant les études à d'autres souris déficientes pour des gènes d'intérêt et infectées oralement à des doses plus physiologiques.

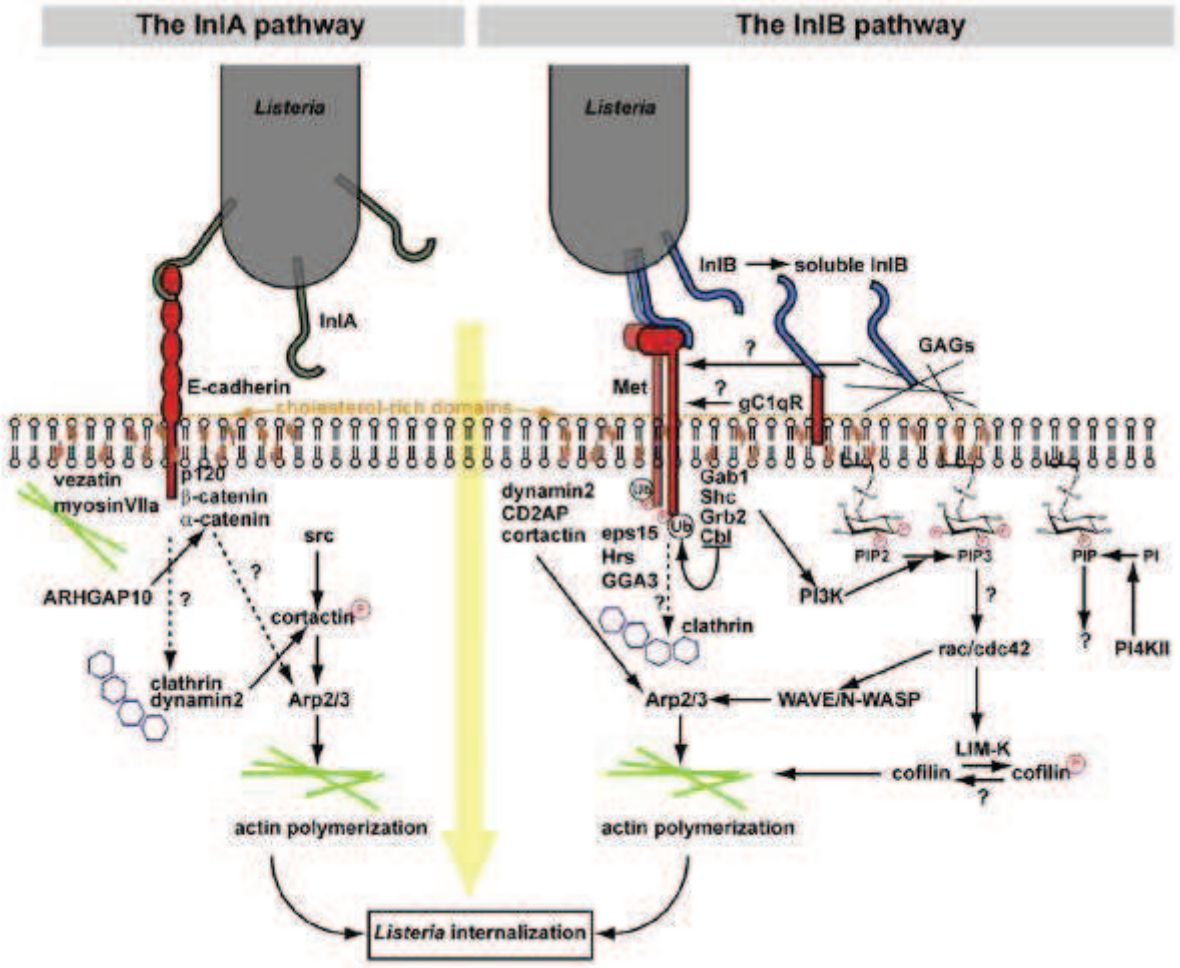



D'après Lecuit, M. 2007 (178)

**Figure 16** : Affinité des Internaline A et B pour leur récepteur selon les espèces. InlA reconnait son récepteur E-cadhérine chez l'humain, le cochon d'Inde et le lapin. InlB a une affinité pour son récepteur Met chez la souris, le rat et l'humain.

Au contraire de InlA, la protéine InlB est seulement associée à la membrane et peut être soluble (207). Le premier récepteur de cette protéine a également été découvert par chromatographie d'affinité et identifié comme étant gC1qR/p32, le récepteur de la partie globulaire du composé C1q intervenant dans la cascade du complément (208, 209). Ce récepteur n'induit pas de signalisation de l'information en raison de l'absence de partie intracellulaire et il a dès lors été émis l'hypothèse qu'un autre récepteur devait être impliqué. Le récepteur à activité tyrosine kinase Met a donc par la suite été découvert comme participant à l'entrée de la bactérie. Met est normalement le récepteur au facteur de croissance des hépatocytes (HGF) et comme le récepteur E-cadhérine, il est détourné de sa fonction première par la bactérie. En effet, Met est recruté sur le site d'entrée de la Listéria et InlB stimule l'autophosphorylation du récepteur afin d'induire le recrutement, par phosphorylation également, des trois protéines que sont Gab1, Cbl et Shc. Ce complexe provoque un remaniement du cytosquelette d'actine dépendant du complexe Arp2/3 et de la PI 3-

kinase (Phosphatidylinositol 3-kinase), également mobilisée vers la membrane plasmique (**Figure 17**) (210, 211).




D'après Cossart, P. 2008 (196)

**Figure 17** : Représentation des étapes successives conduisant au réarrangement du cytosquelette d'actine.

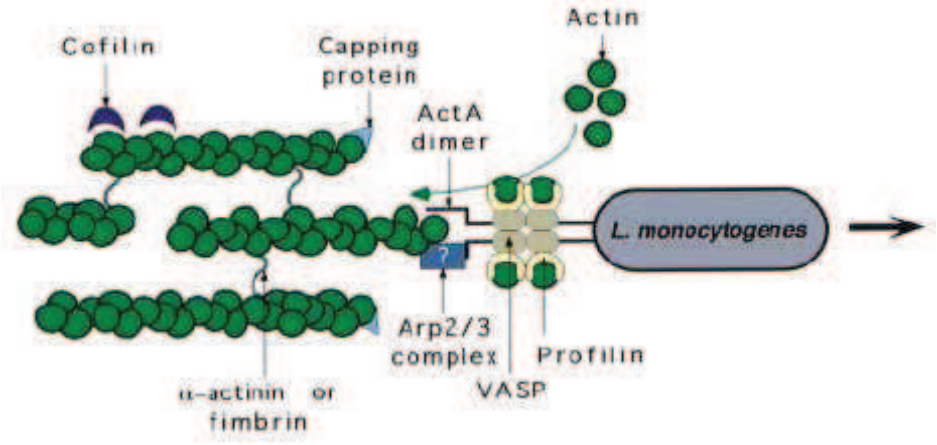
Il semble par ailleurs que Met fonctionne de manière optimum en présence de glycosaminoglycannes (GAGs). En effet, les GAG sont identifiés comme étant un troisième type de ligand reconnu par InlB. Ils sont connus pour leur rôle dans l'oligomérisation des facteurs de croissance comme HGF assurant de cette manière leur protection contre les protéases extracellulaires. InlB se fixe aux GAG afin d'augmenter fortement l'activation de Met. Par ailleurs, GAG peut détacher InlB de la membrane, la protéger des protéases et garder cette protéine au niveau du site d'entrée de la bactérie. InlB reste donc libre d'interagir avec le récepteur Met (212).

De récentes études ont de plus montré que ce processus d'internalisation de la Listéria est clathrine-dépendant (196). Cette protéine, impliquée dans les phénomènes d'endocytose, recruterait après reconnaissance de InlB sur son récepteur Met, la dynamine, elle même recrutant la cortactine. Cette dernière provoquerait la polymérisation de l'actine grâce au complexe Arp2/3 (**Figure 17**) (213).
La Listéria détourne donc la machinerie cellulaire de l'hôte à son profit. Le réarrangement du cytosquelette qu'elle provoque engendre une déformation de la membrane plasmique, permettant ainsi l'internalisation de la bactérie.

Une fois la bactérie entrée dans la cellule de l'hôte, une vacuole destinée à fusionner avec le lysosome se forme dans le but de détruire le pathogène. L.m s'échappe de cette vacuole grâce à la production des PlcA et PlcB et de LLO (**Figure 14, image 2**). La LLO est un membre de la famille des cytolysines cholesterol-dépendante sécrétées par les bactéries Gram-positive comme *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis* (214) (192). La LLO se fixe sur la membrane plasmique d'abord sous forme de monomères puis d'oligomères afin de créer un pore membranaire de 200 à 300 Å de diamètre et de lyser la vacuole (80). Cette LLO est pleinement opérationnelle à un pH inférieur à 6, son activité est donc optimale dans l'environnement acide du phagosome et très réduite dans le milieu neutre du cytoplasme de la cellule. La LLO joue ainsi un rôle crucial dans la dissémination des bactéries puisque les mutants déficients pour cette protéine restent dans les vacuoles et présentent une absence de pathogénicité.

Les bactéries se retrouvent en quelques heures dans le cytoplasme de la cellule hôte où elles peuvent dès lors polymériser l'actine afin de se propulser et d'infecter les cellules voisines (**Figure 14, images 3 et 4**) (193). Cette faculté à passer de cellules en cellules permet à la Listéria d'infecter les tissus sans avoir à passer par le milieu extracellulaire. Elle évite de cette manière les anticorps circulants et les autres composés antibactériens extracellulaires. L.*m* polymérise l'actine de façon symétrique à sa surface afin de produire une queue d'actine la propulsant dans le cytoplasme (193) (194). Cette polymérisation de l'actine de la cellule infectée se fait grâce à la protéine de surface bactérienne Actine A (215, 216). Cette protéine mime l'action des protéines de la famille WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) dont le but est d'activer le complexe Arp2/3 servant de matrice à la polymérisation de l'actine (217). La protéine

VASP est le principal ligand de ActA. Elle recrute la profiline, une protéine se liant à l'actine et initiant la polymérisation des filaments d'actine (**Figure 18**) (218).




D'après Cossart, P. 1998 (195)

**Figure 18** : Modèle d'assemblage de l'actine à l'un des pôles de Listéria. Différentes protéines de l'hôte comme la profiline, VASP, Arp2/3 ou la cofiline sont recrutées afin de polymériser l'actine.

La Listéria se multiplie dans le cytoplasme et va coloniser les cellules voisines par contact cellulaire. Ce phénomène requiert également la polymérisation d'actine afin de former une protrusion membranaire de la cellule infectée (**Figure 14, images 5 et 6**). Cette expansion membranaire est phagocytée par la cellule voisine et engendre la formation d'une vacuole formée de deux membranes et contenant la Listéria (**Figure 14, image 7**). La bactérie va à nouveau produire la LLO mais également une phospholipase nommée lécithinase afin de lyser la double membrane (**Figure 14, image 8**).

La bactérie se retrouve à nouveau dans le cytoplasme, libre d'infecter d'autres cellules. Au vue de toutes les stratégies mises au point afin de contourner et utiliser la machinerie cellulaire de l'hôte, on comprend pourquoi le modèle d'infection par L.m est l'un des plus étudiés sur le plan relation hôte-pathogène. Notre organisme est heureusement lui aussi doté de mécanismes élaborés permettant d'éliminer les pathogènes.

## 7. Mise en place de la réponse immunitaire de l'hôte en réponse à l'infection par Listéria *monocytogenes*

L.*m* est l'un des modèles les plus utilisés afin d'étudier l'immunité innée et adaptative. En effet, ces deux types de réponses sont mises en place afin de contrôler complètement l'infection. Dans nos modèles murins, la Listéria est le plus souvent

administrée par voie veineuse. Les bactéries se retrouvent en quelques secondes dans le foie et la rate où elles sont internalisées par les macrophages résidents (187, 219). La réponse immunitaire innée est mise en jeu très tôt après l'injection et fait appel aux macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques et NK afin de limiter la croissance des bactéries. Cette étape est nécessaire à la mise en place plus tardive d'une réponse Listéria-spécifique des cellules T chargée d'éliminer le pathogène et de développer une réponse mémoire protégeant l'organisme lors d'une deuxième infection.

Les premières cellules de l'immunité innée que rencontre la Listéria sont les macrophages et les neutrophiles. Ces cellules jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la croissance bactérienne en ingérant les pathogènes et en produisant des substances antimicrobiennes (220). Les neutrophiles sont très vite recrutés sur le lieu de l'inflammation et leur déplétion par l'administration d'anticorps anti-Gr1 augmente la susceptibilité des souris à l'infection par Listéria (221, 222). Une fois arrivés sur le site de l'inflammation, les neutrophiles vont produire des chimiokines comme CSF-1 (Colony-Stimulating Factor-1) et MCP-1 (Monocytes/macrophages Chemoattractant Protein-1) destinées à attirer les macrophages sur ce même site (223). Des souris déficientes en CCR2 (CC-chemokine receptor 2) sont incapables de contenir l'infection, montrant ainsi l'importance du recrutement de ces macrophages (224). Les macrophages résidants comme les cellules de Kupffer dans le foie sont les premiers initiateurs de la mort bactérienne. En réponse à l'infection, les macrophages produisent des cytokines pro-inflammatoires comme le TNFα ou l'IL-12 afin notamment d'activer les cellules NK (225). Ces dernières produisent de l'IFNγ dont le rôle est d'activer les macrophages et d'augmenter leur activité antibactérienne (226). TNFα et IFNγ sont essentielles à la réponse précoce contre Listéria puisque les souris déficientes en ces cytokines ou en leurs récepteurs meurent rapidement après l'infection (38, 227, 228). Comme les neutrophiles, les macrophages produisent des réactifs oxygénés et des intermédiaires azotés importants dans l'induction de la mort bactérienne. Le NO est un des effecteurs antibactériens essentiels à l'élimination de Listéria. Les souris déficientes en iNOS sont beaucoup moins résistantes à l'infection et montrent une charge bactérienne beaucoup plus élevée que celle des souris sauvages (229, 230).

La production de TNFα et de NO est donc essentielle pour contenir l'infection. Même si les macrophages semblent être la source majeure de leur production, il semble qu'un certain type de cellules dendritiques nommées TipDC (TNF and iNOS-producing DC) produisent elles aussi ces deux protéines. En effet, l'analyse des populations cellulaires présentes dans la rate de souris sauvages ou CCR2 infectées par Listéria montrent que ces TipDC constituent une source importante de TNF et de NO (40).

L'IFNγ est également une cytokine importante pour le contrôle de l'infection primaire par Listéria et les cellules NK et T γδ en sont une source de production (226, 231). Les souris déficientes en IFNγ sont très sensibles à l'infection primaire (232). En revanche, l'immunisation de ces souris avec une souche atténuée de L.m met en évidence un rôle moindre de l'IFNγ dans l'élaboration de la réponse adaptative après ré-infection (228).

L.m est par ailleurs connue pour induire la production d'IFN de type I (233, 234). Les IFNα et β activent les gènes pro-apoptotiques et sont responsables de la présentation d'antigène afin d'élaborer une réponse anti-virale essentielle à l'éradication du virus. La Listéria tire partie de cette réponse et la détourne à son profit (235). Plusieurs travaux ont montré que l'apoptose des cellules T ainsi que la perte de cellules produisant du TNF sont à l'origine de l'augmentation de la charge bactérienne dans les tissus (236-238). L.m active donc la production des IFN de type I afin de moduler une partie de la réponse immunitaire de l'hôte avec comme but de proliférer et se disséminer dans l'organisme.

Il semble que l'activation des IFN de type I dépend de la capacité de la Listéria à s'échapper de la vacuole et à passer dans le cytosol (239). Les travaux de McCaffrey et col. montrent que l'infection des macrophages par L.m aboutit à l'activation en deux temps des gènes de la réponse immunitaire. On observe en premier lieu l'activation des gènes dépendants de NF-κB. Ce mécanisme est possible grâce à l'activation des TLR et est indépendant de l'invasion des cellules par Listéria. L'activation des gènes IFN de type I se produit dans un second temps et requiert la présence de la bactérie dans le cytosol de la cellule infectée (240). Il apparait que les membres de la famille NOD et NALP participent à la détection intracellulaire de la bactérie et permettent ainsi la synthèse des IFNα et β (145, 151).

La reconnaissance de certains motifs structuraux de la bactérie active les cellules immunitaires et permet la synthèse des cytokines inflammatoires comme le TNFα, l'IFNγ, IL-1β et IL-12. Les TLR participent à la détection de la Listéria et les souris déficientes en MyD88, adaptateur clé des TLR, sont très susceptibles à l'infection et présentent une absence totale de synthèse de cytokines (241, 242). MyD88 est essentiel pour mettre en place la réponse immunitaire innée mais pas la réponse adaptative. En effet, l'infection des souris déficientes en MyD88 avec une souche atténuée de Listéria a permis de montrer que ces dernières développent une réponse CD8+ pathogène-spécifique (243).

Flo et col. ont pu montrer que les cellules CHO transfectées avec le TLR2 humain répondent à la Listéria. Des travaux menés au laboratoire par Torres et *col.* sur des souris déficientes en TLR2 confirment la susceptibilité de ces souris après infection avec une augmentation de la charge bactérienne dans le foie et la rate. Cependant le phénotype est moins fort que celui des MyD88 déficientes, ce qui suggère l'implication d'un autre récepteur détectant la Listéria. Way et *col.* se sont orientés sur la possible reconnaissance de la flagelline par le TLR5. Ils ont pu montrer que ce récepteur n'est pas essentiel à la mise en place de la réponse immunitaire innée et adaptative. Effectivement, certaines souches de Listéria expriment leur flagelle à 22°c et le perdent à 37°c rendant impossible la détection par TLR5. Cette bactérie module ainsi l'expression de la flagelline selon la température environnante pour échapper au système immunitaire de l'hôte (244).

L'organisme a développé tout un système afin de détecter la Listéria de manière intracellulaire. Il semble d'ailleurs que le système immunitaire soit mieux activé lorsque la Listéria passe en intracellulaire que lorsque l'infection se fait par HKLM ou par une listéria déficiente en LLO. Plusieurs travaux réalisés *in vitro* ont montré que les DC sont indispensables pour induire une réponse des cellules T CD8+. Ces DC expriment fortement les molécules de costimulation CD40, CD80 et CD86 seulement si la bactérie est passée dans le cytoplasme. Cette expression est moins forte si l'infection est réalisée avec HKLM. De même, les DC spléniques de souris infectées avec la Listéria vivante expriment plus fortement CD40, CD80 et CD86 que les souris immunisées avec HKLM (245). Par ailleurs, la production des cytokines IL-12, IL-10, IL-6, TNFa par les

DC est elle aussi importante et requiert également le passage de la bactérie dans le cytosol (246). Cette détection cytosolique fait intervenir les protéines de la famille NLR. Ainsi, il semble que NOD2 et NALP3 soient impliqués dans cette reconnaissance. NOD2, particulièrement impliqué dans la reconnaissance du MDP permet la production de cryptidines (l'équivalent murin des défensines humaines) au niveau de l'épithélium intestinal. Les souris déficientes en NOD2 sont susceptibles à l'infection par Listéria administrée par voie gastrique mais pas à la Listéria administrée par voie veineuse (145). De plus, les études menées par Mariathasan et col. sur les macrophages exposés *in vitro* à L.m ont montré que les adaptateurs protéiques ASC et NALP3 sont nécessaires à l'activation de la caspase-1 et donc à la synthèse d'IL-1β. En effet, les macrophages infectés et déficients en NALP3 présentent une diminution d'activation de la caspase-1 se traduisant par une baisse de la production d'IL1β (151). Le ligand de L.m reconnu par NALP3 est pour l'instant inconnu et la détection intracellulaire de la Listéria pourrait également s'effectuer par le biais de son ADN dans le cytosol. Plusieurs travaux ont cependant démontré que cette détection de l'ADN ne se fait pas par RIG-I ni MDA5 (247, 248).

L'immunité innée est essentielle pour contenir l'infection dans un premier temps. La réponse adaptative est elle aussi très importante pour éradiquer totalement les bactéries et les DC semblent assurer le lien entre immunité innée et adaptative (249). Les souris SCID (Severe Combined Immunodeficiency) mettent en place une réponse innée et résistent dans un premier temps à l'infection. Elles développent par la suite une infection chronique en raison de leur incapacité à éliminer complètement les bactéries. Les travaux de Bahrdwaj mettent en évidence le rôle important des cellules T CD8+ puisque leur transfert dans des souris SCID permet une élimination complète des bactéries (250-252). La reconnaissance des cellules infectées par Listéria est critique dans le contrôle de l'infection. La présentation d'antigène se fait généralement par le CMH de classe I (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I) suite à la dégradation par le protéasome des protéines secrétées par L.m Les peptides sont ainsi transportés jusqu'au RE où ils sont chargés sur le CMH de classe I pour être présentés aux cellules T CD8+ (253, 254). Les cellules professionnelles peuvent également présenter les antigènes issus des bactéries dégradées par le lysosome. Les peptides

sont alors présentés par le CMH de classe II aux cellules T CD4+. Les antigènes issus du lysosome peuvent également être chargés par le CMH I via un processus de cross-présentation (255). Parmi les protéines sécrétées par la Listéria, La LLO est l'antigène le plus immunogénique en terme d'induction de réponse de cellules CD8+ spécifiques. La production de cette protéine est pourtant largement diminuée après passage de la bactérie dans le cytosol (256). En effet, la LLO est toxique pour la cellule et donc délétère pour le pathogène. De plus, la LLO possède une séquence riche en acides aminés particuliers reconnus par le protéasome et permettant la dégradation de cette protéine (256). Cette dégradation génère des fragments peptidiques chargés par le CMH de classe I. L'amplitude de la réponse des cellules T CD8+ est ainsi peu affectée par l'abondance des épitopes dans les cellules infectées (257). Wong et col. ont pu montrer *in vitro* que l'exposition transitoire d'antigène est suivie d'une prolifération prolongée des cellules T CD8+ qui ne requiert pas d'autres expositions à l'antigène. La prolifération de ces cellules T CD8+ est donc indépendante de la quantité d'antigène et de la durée d'exposition (258).

La population des cellules T CD8+ est détectable environ quatre à cinq jours après infection par Listéria et le pic de réponse de ces cellules intervient sept à neuf jours après infection (259). Il semble que ces cellules confèrent une protection immunitaire contre Listéria grâce à deux mécanismes agissant de concert. Les cellules T CD8+ induisent d'une part la lyse des cellules infectées grâce à la synthèse de perforine et de granzyme afin d'exposer les bactéries aux macrophages activés. Les cellules T CD8 + produisent d'autre part de l'IFNγ pour activer les macrophages (260). La perforine joue un rôle très important dans la réponse adaptative. Les souris déficientes en perforine sont capables d'éliminer les bactéries presque aussi rapidement que les souris sauvages lors d'une première infection. En revanche, l'administration de Listéria virulente après immunisation les rend très susceptibles à l'infection (261, 262).

Le rôle des cellules T CD4+ est moins bien connu mais il semble qu'elles soient capables de secréter elles aussi de l'IFNγ afin d'aider à l'activation des macrophages (263) et permettraient le maintien d'une réponse CD8+ mémoire contre Listéria (264). En effet, les souris déplétées en CD4+ ou déficientes pour ce type cellulaire montent une réponse primaire CD8+ comparable aux souris sauvages mais perdent leur capacité à

maintenir une réponse CD8+ mémoire et à monter une réponse immunitaire protective en cas de ré-infection (264) (265). Ainsi, le nombre de cellules T CD8+ diminue graduellement en l'absence de cellules T CD4+ malgré la présence d'un nombre similaire de précurseurs des cellules T mémoire (266). Plusieurs travaux révèlent que les cellules T mémoire CD8+ se développent très rapidement après infection et sont ainsi présentes en petites proportions lors de l'infection primaire par Listéria. Lors d'une infection secondaire, ces cellules connaissent une expansion clonale cinq à sept jours après immunisation (267, 268). Ces cellules T mémoire ont un seuil d'activation assez bas leur permettant d'être activées rapidement et d'exercer leur rôle de contrôle de l'infection et d'élimination des bactéries (269).

Ces cellules mémoire expriment un large répertoire TCR (T Cell Receptor) durant l'infection primaire (270). En revanche, les souris immunisées et infectées montrent une prolifération importante de cellules T mémoire exprimant un répertoire TCR restreint avec une plus forte avidité pour les antigènes bactériens (271).

Il semble par ailleurs que les cellules T régulatrices CD4+ CD25+ limitent la prolifération excessive des cellules T mémoire. Ces cellules T régulatrices exercent des activités suppressives sur les autres cellules T en produisant certaines cytokines comme le TGFβ (Transforming Growth Factor) ou l'IL-10. Elles jouent ainsi un rôle préventif dans l'autoimmunité. Dans le cas d'une infection secondaire par Listéria, la déplétion des cellules CD4+ CD25+ induit une augmentation de la prolifération des cellules mémoires. Ces cellules T régulatrices permettraient de moduler la réponse des cellules T mémoire en évitant une réponse trop forte de ces dernières (272, 273).

D'autres études portant sur la réponse adaptative contre Listéria ont par ailleurs montré que la réponse des cellules B joue un rôle relativement mineur dans le contrôle de l'infection. En effet, la majorité des bactéries reste dans le cytosol des cellules infectées et passe de cellules en cellules en évitant tout contact avec le milieu extracellulaire. La production d'anticorps spécifiques de L.m est ainsi très limitée et n'est donc que peu impliquée dans le contrôle de la dissémination des bactéries. Certaines conditions expérimentales ont toutefois démontré qu'un anticorps monoclonal dirigé contre la LLO pouvait empêcher la Listéria de s'échapper du lysosome (274). Ochsenbein et col. ont montré que les souris déficientes en cellules B présentent une

charge bactérienne élevée en comparaison avec des souris immunocompétentes. Il semble donc que la production d'anticorps soit importante pour réduire la dissémination précoce des bactéries dans les organes vitaux (275). Les cellules B contribueraient de plus à maintenir les cellules mémoire générées durant l'infection par Listéria (276). Ces cellules B ainsi que les anticorps produits contre L.m jouent un rôle mineur mais toutefois significatif dans le contrôle de l'infection.

La réponse immunitaire mise en place contre Listéria fait donc intervenir l'immunité innée et adaptative. L'immunité innée permet la production rapide de facteurs anti-microbiens ainsi que de chimiokines et cytokines facilitant la mise en place de la réponse adaptative. La présentation d'antigène par les DC aboutit à une forte réponse des cellules T CD8 et CD4 et à la mise en place d'une population stable de cellules T mémoire.

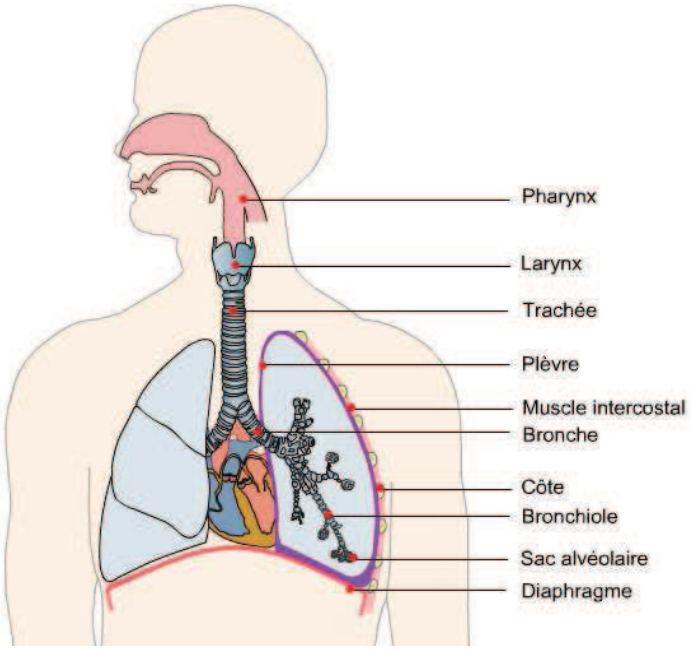
# Chapitre 3 : Etude de l'inflammation pulmonaire induite par la flagelline extraite de Salmonella *typhimurium*

Qu'elles soient pulmonaires, intestinales ou encore urinaires, les muqueuses jouent un rôle très important dans l'homéostasie des tissus et dans l'initiation de l'immunité innée lors d'invasions par les pathogènes. Elles sont un des sites majeurs d'intéractions TLR/PAMP en raison de leur large surface en contact avec l'environnement. Un bon nombre de bactéries flagellées comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionnella pneumophila* ou *Salmonella typhimurium* utilisent la flagelline afin de coloniser les voies respiratoires ou intestinales. Il parait donc important de comprendre les mécanismes de l'immunité mis en place lors de ces infections sévères.

Dans ce chapitre de ma thèse, je me suis particulièrement intéressée aux cellules épithéliales radiorésistantes exprimant TLR5 dans un modèle d'inflammation pulmonaire induite par la flagelline issue de S. *typhimurium*. Cette étude a pu être réalisée grâce à la génération de souris chimériques reconstituées par les cellules myéloïdes sauvages ou TLR5 déficientes.

## 1. Le système respiratoire

Le système respiratoire comprend plusieurs organes comme le nez, le pharynx, la trachée, les bronches et enfin les poumons contenant les sacs alvéolaires où s'ouvrent les alvéoles pulmonaires (**Figure 19**). D'un point de vue fonctionnel, l'appareil respiratoire est constitué d'une zone de conduction et d'une zone respiratoire. La zone de conduction comprend toutes les voies respiratoires acheminant l'air à la zone respiratoire et a pour rôle de filtrer, d'humidifier et de réchauffer l'air inspiré. La zone respiratoire est le siège des échanges gazeux et se compose des bronchioles respiratoires, des conduits alvéolaires et des alvéoles. Le système respiratoire se compose des trois « étages » que sont le tractus respiratoire supérieur comprenant les fosses nasales et le pharynx ; le tractus respiratoire intermédiaire composé du larynx et de la trachée ; le tractus respiratoire inférieur formé des bronches, bronchioles et des alvéoles. L'organisation de l'arbre trachéo-bronchique repose sur la division dichotomique des conduits aériens.




D'après Dominic P. Tremblay, www.ressources-profs.blogspot.com

**Figure 19** : Schéma général du système respiratoire

Chaque bronche mère va donner deux bronches filles se disposant d'une manière bien particulière et notre appareil respiratoire comporte généralement 23 générations de divisions. On parle de bronchioles à partir de la 17ème génération et d'alvéoles à partir de la 20ème génération.

Le système respiratoire humain d'un adulte représente une surface d'environ 70 m2 exposée à chaque respiration à de nombreux antigènes présents dans l'air. Les tractus supérieurs et inférieurs ont ainsi pour rôle de filtrer et purifier l'air. Les poumons sont équipés de plusieurs systèmes mécaniques évitant au système bronchique d'être en contact avec les poussières ou des bactéries. L'épithélium pulmonaire constitue une première barrière physique contre les antigènes. Par ailleurs la sécrétion de mucus et sa composition constitue un autre atout majeur dans l'élimination des poussières et des bactéries. Le système immunitaire doit par ailleurs pouvoir discriminer les différents « corps étrangers » que constituent les poussières, les pollens ou agents pathogènes et déclencher ou non une réponse immunitaire appropriée. Une régulation fine de cette réponse immunitaire doit s'effectuer afin de maintenir l'intégrité des tissus, limiter les dommages au niveau de la surface épithéliale et de pouvoir, le cas échéant, lutter contre les pathogènes. Ce maintien de l'homéostasie immunitaire et le déclenchement d'une

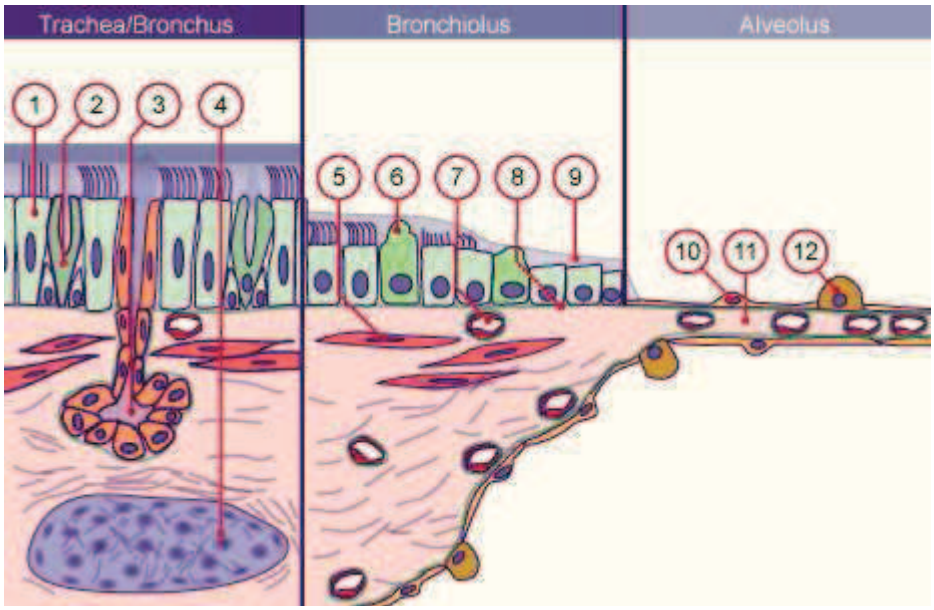
réponse immunitaire reposent sur les relations entretenues par les cellules épithéliales avec les macrophages alvéolaires ou les DC.

## 2. Les systèmes de défenses pulmonaires non spécifiques

Les systèmes de défenses pulmonaires non spécifiques reposent sur l'existence de barrières physiques constituées par l'épithélium pulmonaire. Cet épithélium secrète un mucus protecteur établissant une protection chimique, de par sa composition, et mécanique puisqu'il intervient dans la clairance muco-ciliaire.

### 2.1. L'épithélium pulmonaire

L'épaisseur ainsi que la composition de l'épithélium varie tout au long du tractus respiratoire. Les fosses nasales, la trachée ainsi que les bronches comportent un épithélium pseudostratifié cylindrique contenant des cellules ciliées et muqueuses caliciformes (**Figure 20**). On parle véritablement de muqueuse à partir du nasopharynx. Ce terme de « muqueuse » s'applique à l'épithélium ainsi qu'au tissu conjonctif sous-jacent, la lamina propria, bénéficiant d'une lubrification assurée par les cellules caliciformes. Au niveau de la trachée et des bronches, les cellules ciliées et muqueuses s'étendent sur toute la hauteur de l'épithélium. Les cellules plus courtes qui confèrent à l'épithélium son caractère pseudostratifié servent de cellules souches pour le renouvellement de l'épithélium. Les cellules deviennent de moins en moins hautes au fur et à mesure que l'on descend vers les bronchioles. Les bronchioles terminales se ramifient en bronchioles respiratoires de diamètre inférieur à 1 mm et comportent un épithélium simple cylindrique. Cet épithélium comprend davantage de cellules ciliées alors que les cellules caliciformes laissent leur place à un troisième type cellulaire, la cellule de Clara. Dépourvue de cils et de microvillosités, cette dernière est une cellule de transition entre les cellules des voies de conduction et des voies d'échanges. Elle est capable de secréter les composants protéiques du surfactant alvéolaire présent dans le mucus et présente des potentialités de cellules souches, les cellules basales étant absentes à ce niveau de l'arbre bronchique.




D'après le site www.embryology.ch élaboré par les Universités de Fribourg, Lausanne et Berne

**Figure 20 :** Représentation schématique comparative de l'épithélium des voies pulmonaires. **1**.épithélium cilié ; **2**.cellules en gobelet (ou caliciformes) ; **3**.glande ; **4**.cartilage ; **5**.musculature lisse ; **6**.cellules de Clara ; **7**. capillaire ; **8**. membrane basale ; **9**. mucus ; **10**. pneumocytes de type I ; **11**.septa alvéolaires ; **12**. pneumocytes de type II.

Les bronchioles respiratoires sont le site d'échanges gazeux et se ramifient en conduits alvéolaires se terminant chacun par un sac alvéolaire. Leur épithélium, simple et pavimenteux, est fragile et se compose de pneumocytes 1 et 2. Les pneumocytes 1 sont très étalés et servent à la diffusion passive des gaz. Les pneumocytes de type 2 comportent à leur pôle apical des microvillosités. Métaboliquement très actifs, ils peuvent également secréter les protéines du surfactant alvéolaire et intervenir dans le repeuplement cellulaire de l'épithélium.

## 2.2. La clairance muco-ciliaire

Le système de clairance des conduits aériens permettent d'éviter le dépôt de poussières dans les alvéoles pulmonaires dont l'épithélium est particulièrement fragile. Ce système fait intervenir un couplage efficace entre le mucus et le mouvement ciliaire.

Le mucus forme un revêtement tapissant les voies de conduction. Il joue le rôle d'un piège à particules et humidifie l'air inspiré. Ce gel, de viscosité croissante depuis la surface épithéliale à la lumière du conduit, est assimilé à un milieu biphasique composé d'une phase très fluide et profonde dans laquelle baignent les cils ainsi que d'une phase

superficielle viscoélastique. L'activité ciliaire va entrainer la phase visqueuse du mucus vers l'oropharynx avec une vitesse croissante en remontant des bronches vers la trachée.

### 2.3. Composition du mucus

La barrière épithéliale ainsi que les mouvements ciliaires empêchent les particules dont le diamètre est supérieur à 5 µm de gagner la partie la plus basse du système respiratoire. En revanche, les particules plus petites peuvent passer à travers ces défenses et gagner les bronches et bronchioles. La composition du mucus joue alors un grand rôle dans l'élimination des bactéries et pour garantir la stérilité des poumons. Les cellules du tractus respiratoire produisent donc toutes une variété de molécules antimicrobiennes ayant une activité directe sur les pathogènes ou favorisant leur élimination par les phagocytes. On trouve parmi ces composés le lysozyme, les immunoglobulines A et G, les défensines, les cathélicidines et les collectines (277, 278). Identifiées en 1985 par Ganz et col., les défensines sont des peptides cationiques comportant deux groupes, les défensines α et β (279, 280). Un troisième groupe, les défensines θ, a depuis été décrit chez le macaque rhésus mais ne semble pas être actif chez l'humain (281). Les défensines sont abondantes dans les cellules et les tissus impliqués dans la réponse de l'organisme contre les infections microbiennes. Elles se retrouvent concentrées dans des granules de stockages des cellules phagocytiques. Lorsque ces cellules ingèrent le pathogène, les granules fusionnent avec le phagolysosome et libèrent les défensines (282, 283). Ces peptides antimicrobiens agissent contre les bactéries Gram-positive et négative ainsi que sur les champignons et certains virus (284, 285) en formant des pores membranaires (286, 287). Les défensines exercent par ailleurs leur pouvoir antimicrobien dans des conditions de faibles concentrations ioniques (288, 289). Certains travaux ont d'ailleurs porté sur les conséquences du dysfonctionnement des canaux ioniques CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) impliqués dans la fibrose cystique, sur l'activité des défensines (290, 291). La perte des fonctions des canaux CFTR a pour conséquences l'élévation de la concentration en sels au niveau de la muqueuse épithéliale. Ceci aboutit à l'inhibition de l'activité des défensines et autres peptides antimicrobiens et provoque

des infections récurrentes impliquant notamment *Pseudomonas aeruginosa* (292). Il semble par ailleurs que certaines défensines possèdent la propriété d'attirer les monocytes, les cellules T ou les DC (293-296). Ainsi, les défensines HBD1 et HBD2 peuvent se lier au récepteur CCR6 afin d'attirer les cellules T mémoires et les DC immatures (295).

Le surfactant protéique est lui aussi présent dans le mucus pulmonaire. Il existe à ce jour quatre types de surfactant protéique, SP-A, B, C et SP-D. Ces molécules sont des récepteurs solubles appartenant à la famille des collectines (pour collagenous lectine) en raison de leur région contenant du collagène et leur domaine de type lectine C (297-300). Les collectines sont formées de trois sous-unités assemblées formant une structure en bouquet, comme SP-A, ou cruciforme, comme SP-D (301, 302). Ces protéines reconnaissent un large spectre de motifs, comme les carbohydrates, les lipides ou les acides nucléiques. Elles ont ainsi la propriété de reconnaitre les endotoxines comme le LPS (303, 304) , les galactocéramides (305) ou encore l'ADN des cellules apoptotiques afin de faciliter leur phagocytose par les macrophages (306, 307). Il a par ailleurs été déterminé que SP-A possède une structure similaire à la protéine C1q du complément lui permettant d'empreinter son récepteur afin d'initier la phagocytose (308). Il apparait ainsi que certaines collectines comme la MBL (Mannose-binding lectin) peuvent induire l'activation de la cascade du complément sans l'intervention du composant C1q (309, 310). Ce mécanisme constitue la troisième voie d'activation du complément (311). Chacune de ces voies aboutit à la formation du complexe d'attaque membranaire formant des pores dans la membrane des bactéries ou des cellules eucaryotes. Un phénomène d'anaphylatoxine conduisant à la dégranulation des mastocytes et l'opsonisation des pathogènes se produit également.

Le mucus pulmonaire est également riche en lysozyme, une hydrolase acide clivant les chaines des peptidoglycanes de la membrane de certains pathogènes. On y retrouve également la lactoferrine, une enzyme capable de fixer le fer et d'entrer en compétition avec les pathogènes utilisant l'ion ferrique.

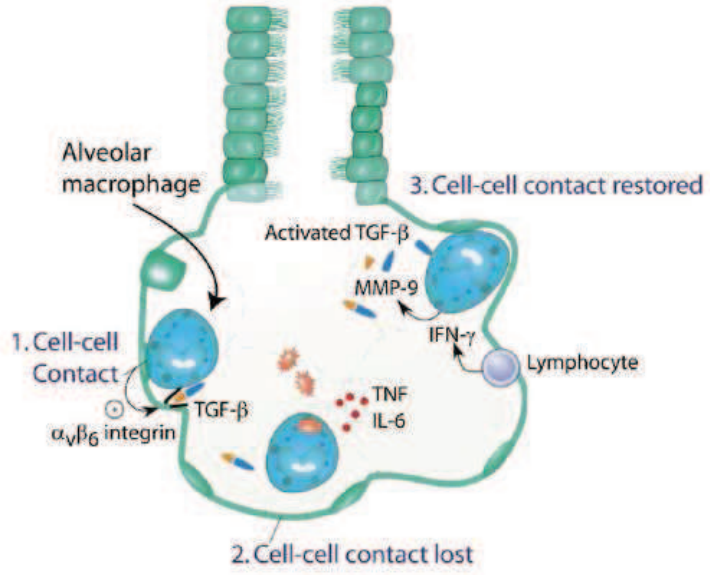
## 3. Les acteurs du système immunitaire pulmonaire

### 3.1. Les macrophages alvéolaires

Les macrophages alvéolaires jouent un rôle important dans la maintenance de l'homéostasie immunologique et dans la défense de l'hôte. En conditions basales, la principale fonction des macrophages alvéolaires est de phagocyter les particules antigéniques afin de ne pas induire de réponse immunitaire spécifique (312).

D'origine hématopoiétique, les macrophages sont distribués dans les tissus où ils jouent un rôle important dans l'homéostasie et dans la réponse immunitaire contre les pathogènes. Une de leur particularité est de pouvoir moduler leur rôle en fonction de leur différenciation et des facteurs environnementaux. Dans les poumons, les macrophages résidents alvéolaires sont constamment en contact avec les particules inhalées. Ils sont gardés à l'état quiescent afin d'éviter une réponse causant des dommages aux cellules épithéliales. Ils produisent d'une part une faible quantité de cytokines inflammatoires et montrent, d'autre part, une faible activité phagocytique (313). De plus, il semble que ces macrophages alvéolaires suppriment la réponse adaptative en agissant sur les DC et les cellules T logées dans le tissu pulmonaire (314). En effet, l'administration de clodronate élimine les macrophages alvéolaires et il en résulte une augmentation de la présence de cellules présentatrices d'antigène dans les ganglions lymphatiques associés au tissu. Il se produit alors une augmentation de la réponse inflammatoire contre les particules inhalées normalement inoffensives (314). Les travaux de Holt et col. ont montré que les macrophages alvéolaires étaient en contact proche avec les cellules épithéliales et donc séparés des DC. L'activité de présentation d'antigène des DC est augmentée lorsque les souris sont déficientes en macrophages alvéolaires (315). Un rôle important de l'intégrine aVβ6 dans le maintien de l'homéostasie pulmonaire a été démontré : les souris déficientes en cette protéine montrent une activation constante des macrophages alvéolaires en raison d'une perte d'activation du TGFβ dans les poumons (316). Le contact cellulaire entre macrophages alvéolaires et cellules épithéliales induit l'expression de l'intégrine aVβ6 sur les cellules épithéliales (**Figure 21, étape 1**). Cette protéine se lie également à un fragment peptidique du TGFβ afin de l'activer et de garder les macrophages alvéolaires à l'état quiescent (317). L'activation des TLR exprimés par les macrophages provoque une perte d'expression de l'intégrine aVβ6 par les cellules épithéliales et donc une perte d'activation du TGFβ (**Figure 21, étape 2**). Les macrophages, alors activés, produisent

des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF ou l'IL-6 et retrouvent par ailleurs leur capacité de phagocytose. Quelques jours après l'activation des macrophages alvéolaires, les lymphocytes recrutés sur le site de l'inflammation produisent de l'IFN-γ stimulant la production de la métalloprotéinase MMP-9 par les macrophages (**Figure 21, étape 3**). Cette étape permet l'expression du TGFβ et le donc le retour à un état quiescent des macrophages alvéolaires (317).



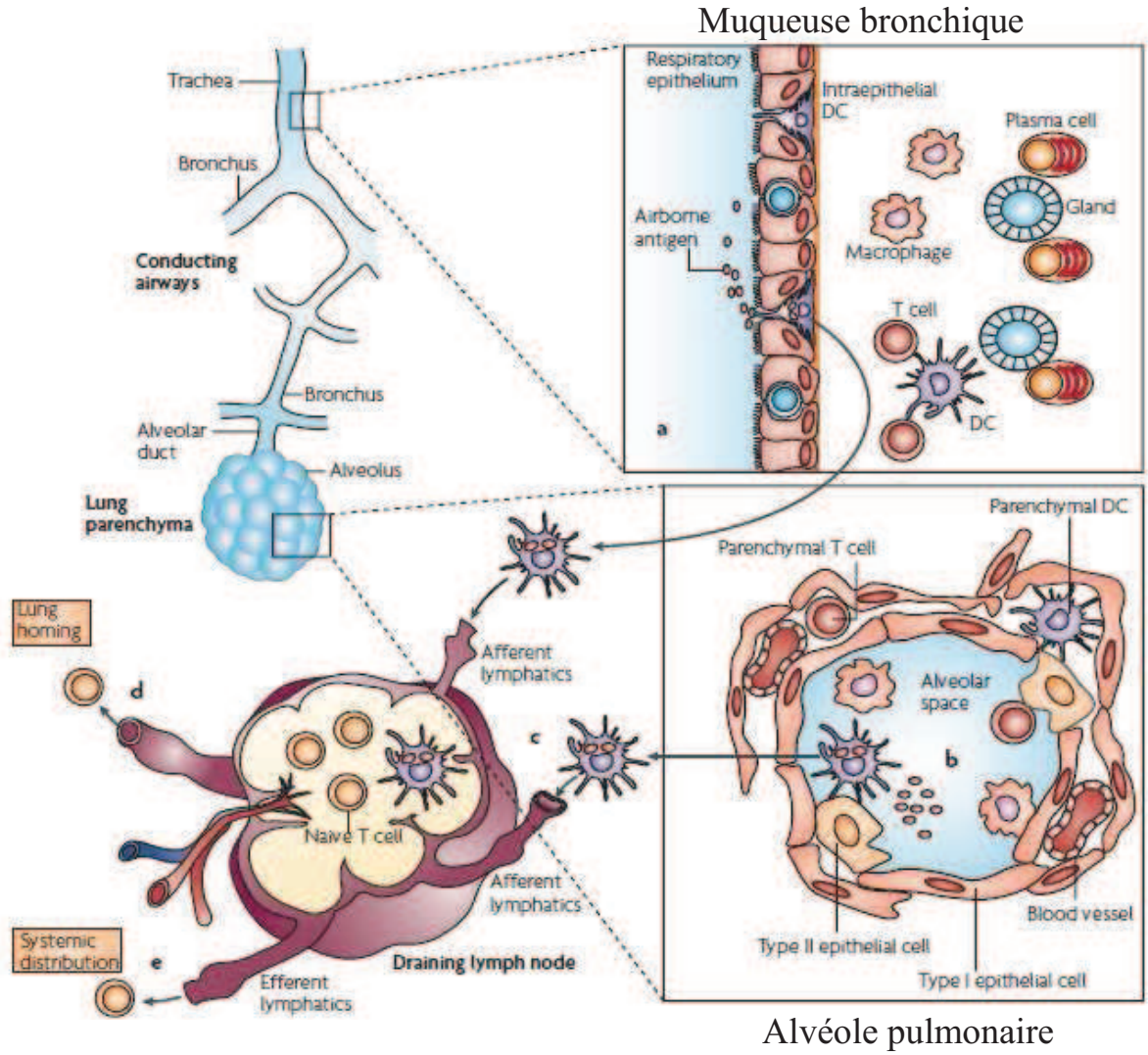

D'après Lambrecht, B. Immunity 2006 (318)

**Figure 21** : Rôle des macrophages dans l'homéostasie pulmonaire et dans la réponse immunitaire contre les pathogènes. (1) Les macrophages alvéolaires sont en contact étroit avec les cellules épithéliales grâce à l'expression de l'intégrine αVβ6. (2) Après activation des TLR, les macrophages se détachent des cellules épithéliales et échappent à l'inhibition exercée par le TGFβ ; ils retrouvent leur propriétés de phagocytose et production de cytokines inflammatoires. (3) La production d'IFN-γ par les lymphocytes induit l'expression de la MMP-9 et permet le retour à un état quiescent des macrophages alvéolaires.

### 3.2. Les cellules dendritiques

La muqueuse pulmonaire comporte un réseau dense de DC principalement de type myéloïde (mDC) (319, 320). On trouve également des DC résidant dans le poumon, appelées AMDC (Airway Mucosal Dendritic Cells), et spécialisées dans la surveillance antigénique. Ces cellules sont disposées de manière stratégique au niveau de l'épithélium afin d'exposer leurs dendrites directement en contact avec la lumière pulmonaire (321), de manière semblable aux DC présentes dans le tissu intestinal (321). Ces AMDC remplissent, à l'état basal, le rôle de sentinelle en contrôlant la muqueuse et en

capturant les antigènes sans pour autant les présenter aux cellules T (322). On retrouve d'ailleurs ces cellules T (effectrices ou mémoires) en nombre important dans la muqueuse, que ce soit en position intraépithéliale ou au niveau de la lamina propria (**Figure 22**) (323).




D'après Holt P. Nat. Rev. Immunol. 2008

**Figure 22** : Organisation du système immunitaire des poumons.
Les particules inhalées sont capturées par les macrophages alvéolaires ou les DC au niveau de la muqueuse bronchique (**a**) et des alvéoles (**b**). Les DC migrent vers les ganglions lymphatiques (**c**) afin de présenter l'antigène aux cellules T naïves. Les cellules T activées prolifèrent et migrent à leur tour dans le parenchyme pulmonaire (**d**) ou passent dans la circulation sanguine (**e**) selon le profil de récepteur définissant leur destination.

Que ce soit au niveau des bronchioles ou des alvéoles pulmonaires (**Figure 22a et b**), les DC sont capables de reconnaitre des antigènes en contact avec le tissu et de les ingérer.

Il en résulte l'expression du récepteur CCR7 et par conséquent leur migration vers les ganglions lymphatiques où elles activent les cellules T naïves (324). Ces cellules T activées migrent via les vaisseaux lymphatiques efférents vers le parenchyme pulmonaire (**Figure 22d**) ou passent dans la circulation sanguine pour gagner d'autres muqueuses (**Figure 22e**).

### 3.3. Les neutrophiles

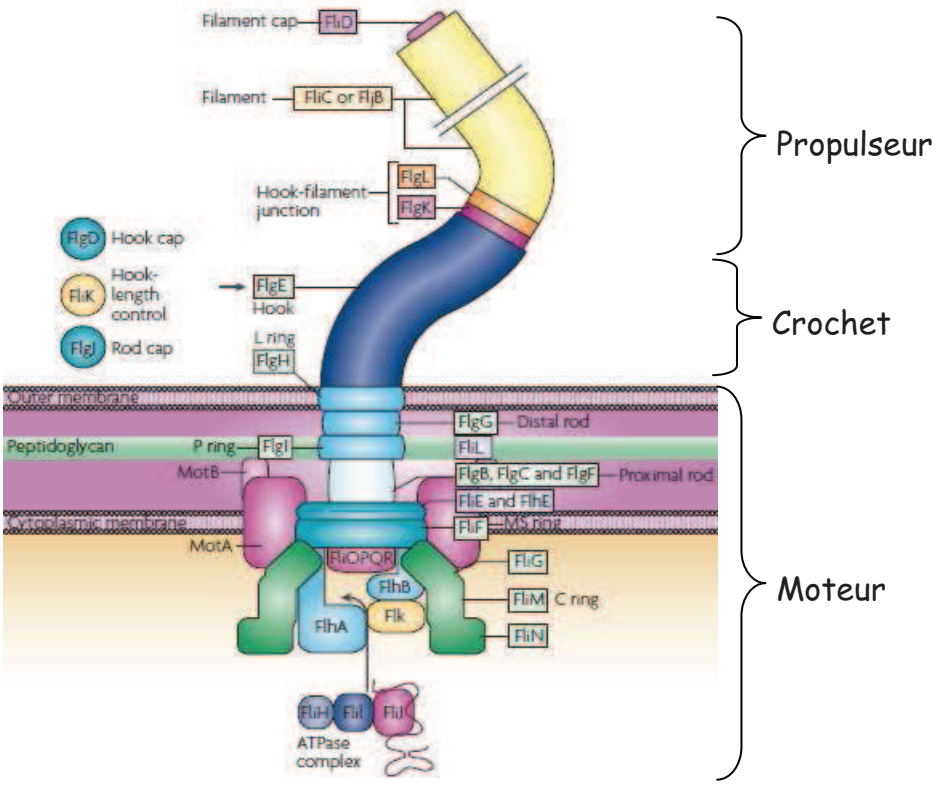
Les neutrophiles représentent chez l'humain la plus large population de phagocytes intravasculaires et sont essentiels à la réponse immunitaire contre les pathogènes (325, 326). Ces cellules ont pour rôle de surveiller les éventuelles entrées de pathogènes dans la circulation sanguine et peuvent rapidement migrer dans les tissus infectés sous le contrôle de médiateurs de l'inflammation.

En conditions normales, on ne retrouve que très peu de neutrophiles dans l'espace alvéolaire (327). Le tissu vasculaire pulmonaire est en revanche très riche en neutrophiles, constituant ainsi un réservoir de cellules immunitaires pouvant être rapidement recrutées en cas d'infection (328). De nombreuses études ont pu montrer que l'administration de LPS ou de bactéries induit, en trois à quatre heures, le recrutement de neutrophiles, constituant ainsi 60 à 80% de cellules totales dans le lavage broncho-alvéolaire (329, 330). En plus d'ingérer et de tuer les bactéries (325, 330), ces cellules produisent un certain nombre de cytokines telles que le TNFα, IL-1β ou IL-6 (331). Les neutrophiles participent donc localement à la régulation de la réponse immunitaire durant une infection pulmonaire et une inflammation.

## 4. La flagelline, constituant du flagelle bactérien

Le flagelle est un organelle complexe, long de 15 µm, permettant aux bactéries qui le possède de se mouvoir. Constitué approximativement de deux douzaines de protéines (332), le flagelle de *Salmonella enterica* de serovar *typhimurium* est utilisé comme archétype de cette structure et permet d'étudier son impact sur le système immunitaire.

Le flagelle se compose à sa base d'un moteur intégré dans la membrane plasmique qui consiste en un rotor. Vient ensuite le crochet qui permet l'articulation entre le moteur et le filament hélicoïdale responsable de la propulsion (**Figure 23**).

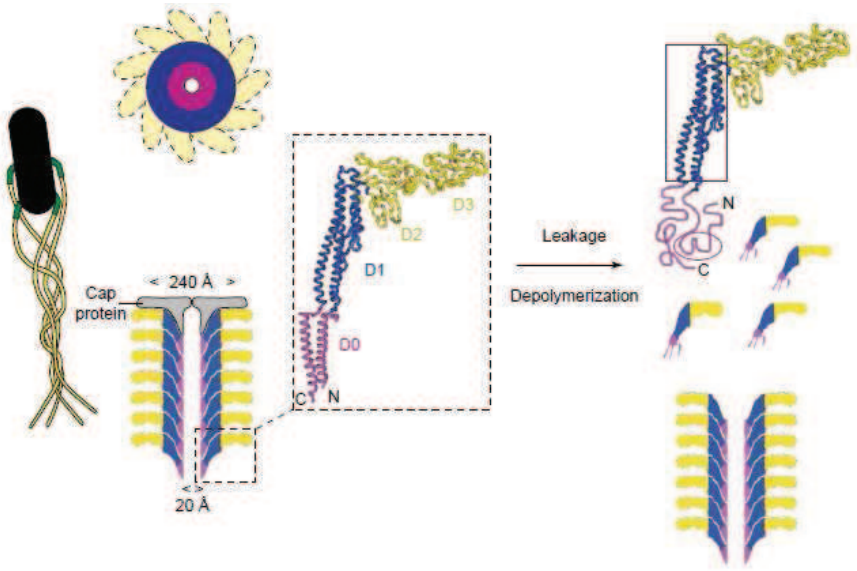



D'après Chevanche, F. Nat. Rev. Microbiology 2008 (332)

**Figure 23:** Protéines composant le flagelle de *Salmonella Typhimurium*.

Le propulseur consiste en un long filament composé d'environ 20 000 sous-unités de flagelline nommée FliC. Cette protéine est synthétisée puis exportée à l'extrémité distale du filament par le mécanisme de sécrétion T3SS (Type III Secretion System) servant également de facteurs de virulence utilisés par les pathogènes (333-335).

La masse moléculaire de la flagelline varie de 28 à 80 kDa suivant les espèces bactériennes (336) et comporte quatre domaines représentés dans la **Figure 24**. Les régions N et C-terminales constituent les domaines conservés D0 et D1 reconnus par TLR5 et structurés en hélice α (337, 338). En revanche, les domaines globulaires D2 et D3 organisés en feuillet β sont hypervariables, exposés en périphérie de la molécule et détectés par les anticorps (339, 340).




D'après Ramos, H. Trends in Microbiology 2004 (341)

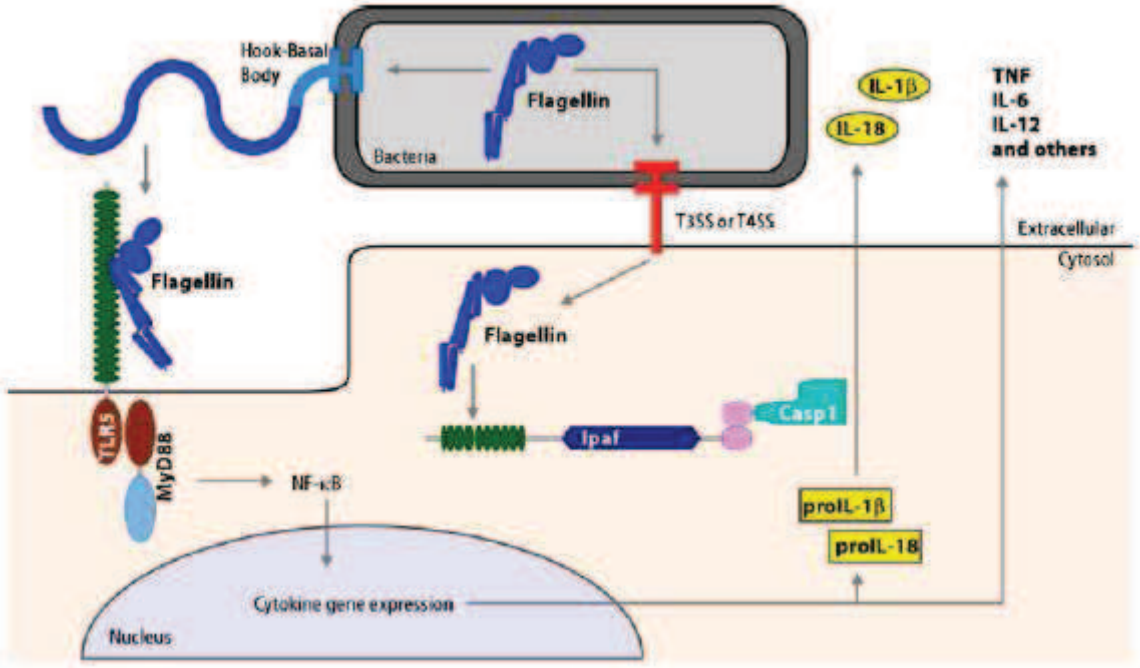
**Figure 24 :** Organisation du flagelle et de la flagelline de S. *typhimurium*. Vue transversale et longitudinale du flagelle. Les monomères de flagelline sont organisés en quatre domaines : D0 et D1 sont conservés, D2 et D3 sont hypervariables. Les deux hélices α encadrées en bleu sont reconnues par TLR5 ; le motif linéaire encerclé en rouge est reconnu par FSL2 chez les plantes. FSL2, Flagellin Sensitive Recteptor.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'épithélium pulmonaire et le mucus qui le recouvre constituent une barrière physique et chimique contre les pathogènes. La capacité des bactéries à coloniser l'organisme dépend pour beaucoup de leur mobilité donc de leur flagelle, et c'est le cas de *Pseudomonas aeruginosa* (342). De même, la flagelline permet la colonisation des intestins et de l'estomac par *Vibrio cholerae* et *Helicobacter pylori* respectivement (343, 344). De plus, la flagelline confère à certaines bactéries des propriétés d'adhésion qui pourraient être portées par les domaines hypervariables D3 ET D4. Ainsi, P. *aeruginosa* se lie à Muc1, une mucine composant le mucus pulmonaire, ce qui lui permet de se nicher dans l'épithélium (345). La bactérie entéropathogénique *Escherichia coli* emploie également la flagelline afin d'adhérer à la muqueuse intestinale (346).

## 5. Détection de la flagelline par le système immunitaire

Détectée par le système immunitaire inné, la flagelline est reconnue dans le milieu extracellulaire par le TLR5 (97) et dans le cytoplasme par Ipaf et Naip5 (347-349) (**Figure 25**). Le TLR5 répond plus généralement aux bactéries flagellées tandis que Ipaf et Naip5 détectent les bactéries produisant la flagelline et des facteurs de virulence.

De manière conceptuelle, la détection par les TLR constitue une « alerte jaune » indiquant que les pathogènes ont franchi les barrières épithéliales. Les NLR émettent une alerte rouge signifiant à l'organisme que les pathogènes ayant franchi les barrières physiques de l'organisme produisent des facteurs de virulence portant atteinte à l'hôte.




D'après Miao, E. Semin Immunopathol 2007 (350)

**Figure 25:** Détection extracellulaire et intracellulaire de la flagelline et signalisation.
La flagelline est détectée en extracellulaire par TLR5 et aboutit par l'intermédiaire NF-κB à la synthèse de médiateurs de l'inflammation tels que le TNF, IL-6, IL-12. Ipaf reconnait la flagelline injectée dans le cytoplasme par les protéines de virulence T3SS et active la caspase 1 afin de produire de l'IL-1β et de l'IL-18.

## 5.1. Détection extracellulaire de la flagelline et signalisation

TLR5 agit en homodimère afin de détecter la flagelline et son domaine intracellulaire recrute la protéine adaptatrice MyD88 mais pas TIRAP (97, 99, 351). Cette reconnaissance active la translocation du facteur NF-κB (352) grâce à la voie IRAK4, IRAK1 et TRAF6 (353, 354). Les MAP kinases p38 et ERK sont également activées (355, 356) et permettent, avec NF-κB, l'expression de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines (357). Il semble par ailleurs que TLR5 dispose d'une boucle de régulation négative grâce à la PI3 kinase (358, 359).

Le TLR5 n'est pas exprimé par les DC conventionnelles ou les macrophages dérivés de la moelle osseuse (360) mais semble plutôt exprimé par les cellules CD11c+ de la lamina

propria intestinale (357). Plusieurs études ont montré l'implication de ce récepteur dans la protection contre S.*typhimurium* ou P. *aeruginosa* respectivement après infection péritonéale et intranasale (361). Il semble en revanche que la voie d'infection ait une certaine importance dans la résistance ou la susceptibilité à S.*typhimurium*. En effet, l'administration orale de cette bactérie à des souris déficientes en TLR5 diminue la charge bactérienne dans les intestins et il en résulte une augmentation de la survie des animaux (357). Ces différents résultats suggèrent que l'activation de TLR5 peut être bénéfique ou au contraire porter détriment à l'hôte infecté selon la bactérie et la voie d'infection. Certains pathogènes contournent par ailleurs la réponse immunitaire de l'organisme en exprimant une flagelline mutée dans son domaine D1 et empêchant la reconnaissance par TLR5 (362). Ainsi, les ε-protéobactéries telles que *Campylobacter jejuni* ou *Helicobacter pylori* requièrent absolument une certaine mobilité afin de coloniser l'organisme et comportent pour cela des mutations évitant la détection par TLR5 aussi bien que la restauration de la polymérisation de la flagelline (362, 363).

Par ailleurs, il existe un polymorphisme de TLR5 avec par exemple la présence d'un codon stop favorisant la susceptibilité des personnes à l'infection par L. *pneumophila* ou à la maladie de Crohn (101, 364). Il semble donc que TLR5 joue un rôle important dans la protection ainsi que dans l'homéostasie des muqueuses, quelles soient pulmonaires, intestinales ou urinaires (361, 365-367). De plus, les travaux de Mizel suggèrent que TLR5 peut former un hétérodimère avec TLR4 afin d'induire la production de NO après stimulation de lignée cellulaire macrophagique par la flagelline (368). Les travaux de Feuillet en 2006 (361) et ceux de Ramphal montrent la nécessité d'une collaboration entre le TLR4 et le TLR5 dans le contrôle de l'infection pulmonaire par P. *aeruginosa* (369).

Afin d'explorer la contribution de l'épithélium et des cellules hématopoïétiques dans la réponse pulmonaire locale à la flagelline, nous avons préparé des souris chimériques pour le récepteur TLR5. Les souris TLR5 déficientes ou sauvages ont été irradiées afin de les dépléter en cellules myéloïdes et ont été reconstituées avec des cellules hématopoïétiques provenant de souris sauvages ou déficientes en TLR5. Ce type de modèle a récemment été effectué par d'autres équipes étudiant le rôle des cellules épithéliales résistantes à l'irradiation et des cellules myéloïdes radiosensibles dans la

réponse immunitaire innée ou adaptative après administration systémique de flagelline (370). Ainsi, les cellules radiosensibles sont à l'origine de la production des cytokines TNF, IL-12 et IL-6 alors que les cellules radiorésistantes produisent des chimiokines telles que le KC (Keratinocyte-derived chemokine), IP-10 (IFN-γ-induced protein of 10kDa) et MCP-1 (370). Cette production de cytokines permettrait d'activer les DC de manière indirecte afin de monter une réponse adaptative efficace. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Salazar-Gonzalez (371) et se rapprochent des résultats obtenus dans notre modèle d'inflammation pulmonaire induit par administration intranasale de la flagelline.

### 5.2. Détection de la flagelline cytoplasmique et signalisation

La détection intracellulaire de la flagelline s'effectue grâce à Ipaf et Naip5 (également nommée birc1e pour Baculovirus inhibitor of apoptosis repeat-containing 1). Ipaf contient les trois domaines caractéristiques des NLR, à savoir le domaine de signalisation CARD, le domaine d'oligomérisation NOD, et enfin une région riche en Leucine LRR. Naip5 contient trois domaines BIR en N-terminal (348, 349, 372).

Ipaf et Naip5 ont été identifiés comme activant la caspase-1 afin de participer à la signalisation apoptotique et à la production de cytokines (373, 374). Ainsi, l'infection des macrophages par S. *typhimurium* et L. *pneumophila* induit l'activation de la caspase-1 grâce à ces deux protéines et plusieurs travaux ont montré que des mutants de ces deux bactéries qui ne pouvaient exprimer la flagelline, sont incapables d'activer la caspase-1 (347, 348, 375). Ce phénotype n'est pas dû à l'absence de mobilité de la bactérie puisque les mutants qui ne polymérisent pas la flagelline mais qui l'expriment sous sa forme monomérique peuvent activer la caspase-1 (375, 376).

La flagelline extracellulaire mise en présence de macrophages n'induit pas l'activation de la caspase-1 et la manière dont la flagelline est délivrée dans le cytosol demeure peu claire. L'utilisation de bactéries exprimant la flagelline et pouvant entrer dans le cytosol des cellules par perméabilisation membranaire permet de démontrer l'activation de la caspase-1 par la flagelline cytosolique (347, 348). Il a ainsi été émis l'hypothèse que la flagelline est directement injectée avec d'autres protéines de virulence dans le cytosol grâce au système de sécrétion T3SS de S. *typhimurium* et T4SS de L. *pneumophila*

(335, 377, 378). En effet, les bactéries telles que S. *typhimurium* dispose de ce système de sécrétion afin d'injecter à l'hôte des protéines permettant le réarrangement des filaments d'actine induisant une déformation de la membrane plasmique et l'internalisation des bactéries par macropinocytose (379). Il semble que lors de ce transfert, le pathogène injecte une petite quantité de flagelline qui sera donc reconnue par Ipaf ou Naip5.

L'activation de la caspase-1 permet la maturation puis la production de la pro-IL1-β en IL1-β ainsi que celle d'IL-18 et d'IL-33 (149, 380).

IL1-β induit par la voie MyD88, une inflammation locale et provoque de la fièvre (11). IL-18 induit la production d'IFN-γ par les lymphocytes (381).

La caspase-1 est également responsable d'un mécanisme appelé pyroptose. Contrairement au phénomène d'apoptose faisant intervenir les caspases-2, 3, 6, 7, 8, 9 et 10, la pyroptose est uniquement dépendante de la caspase-1 (382-384). La pyroptose est une mort cellulaire programmée dépendante d'un signal comme l'activation de Ipaf ou Naip5. Ce mécanisme provoque une perte de l'intégrité membranaire aboutissant au largage du contenu cytoplasmique dans l'espace extracellulaire. A la différence du phénomène d'apoptose, la fragmentation de l'ADN ne fait pas intervenir de condensation de la chromatine (384).

### 5.3. Quelle est la contribution de TLR5 et d'Ipaf dans la détection de la flagelline ?

TLR5 et Ipaf reconnaissent la flagelline selon le domaine LRR qui leur est propre. Il semble que TLR5 entre en intéraction directe avec la flagelline au niveau des domaines conservés de cette protéine (362, 385). Bien que ces domaines D0 et D1 (**Figure 24**) soient importants dans la détection de la flagelline par Ipaf, aucune preuve n'a été apportée concernant l'intéraction directe de ces deux protéines avec la flagelline.

La contribution de TLR5 et Ipaf dans la réponse immunitaire n'est pas encore très documentée. TLR5 induit la sécrétion d'IL-12 alors que Ipaf permet la production d'IL-18. Ces deux cytokines agissent ensemble afin d'activer la sécrétion d'IFN-γ par les cellules Th1 (386). De plus, TLR5 permet l'expression de la pro-IL-1β et Ipaf permet la maturation de celle-ci en IL-1β (374, 380). Ces deux systèmes ont chacun un rôle bien

précis et semblent complémentaires. TLR5 détecte les bactéries les moins virulentes et n'exprimant que la flagelline alors que Ipaf n'engage de réponse que si la bactérie exprime la flagelline avec des facteurs de virulence. Dans ce deuxième cas, la production de molécules pro-inflammatoires telle que l'IL-1β permet l'activation de la réponse immunitaire adaptative.

# RESULTATS

# Chapitre 1 : Etude de la réponse immunitaire innée après administration par voie veineuse de Listéria *monocytogenes*.

---

**Article 1:** CD14 Works With Toll-Like Receptor 2 To Contribute To Recognition and Control of *Listeria monocytogenes* Infection.

Laure Janot, Thomas Secher, David Torres, Isabelle Maillet, Josef Pfeilschifter, Valerie F. J. Quesniaux, Regine Landmann, Bernhard Ryffel, and François Erard. Journal of Infection disease, 2008:198.

---

Lorsqu'il est confronté à une agression d'origine bactérienne comme c'est le cas avec *Listeria monocytogenes*, l'organisme met immédiatement en place une réponse immunitaire innée. Ce mécanisme fait intervenir les récepteurs TLR destinés à reconnaitre des motifs microbiens appelés PAMP.

Les études menées sur les souris déficientes en TLR2 mettent en évidence l'implication de ce récepteur dans la résistance à la Listéria (92). La médiation du signal induit par TLR2 se fait par la protéine adaptatrice MyD88 et aboutit à la production de cytokines inflammatoires, comme le TNF ou l'IL-6, ainsi que de dérivés nitriques aux propriétés antimicrobiennes comme le NO. Ainsi, la résistance des souris déficientes en TLR2 est diminuée après administration intraveineuse de Listéria. Cette susceptibilité s'accompagne d'une charge bactérienne importante dans le foie et la rate avec la formation de microabcès comprenant les cellules infectées entourées de macrophages et de neutrophiles recrutés sur le lieu de l'inflammation. Par ailleurs, les souris déficientes en MyD88 présentent ce même phénotype mais de manière accrue signifiant la possible implication d'un récepteur supplémentaire utilisant cette protéine adaptatrice. Les souris déficientes en TLR3, TLR4 et TLR9 testées au sein du laboratoire montrent que l'absence de chacun de ces récepteurs ne compromet pas leur résistance à l'infection.

CD14 est un co-récepteur impliqué dans la détection de certains motifs bactériens. Il ne possède pas de domaine intracellulaire permettant la signalisation de l'information et doit ainsi interagir avec un récepteur TLR afin d'activer les cellules

immunitaires. Initialement connu pour transférer le LPS au complexe TLR4/MD2 (131), il intervient avec TLR2 dans la reconnaissance des peptidoglycanes de *Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* ainsi que du cytomégalovirus humain (138, 139). Certains travaux utilisant des anticorps neutralisant le CD14 ont montré son implication dans la reconnaissance de HKLM (140). Il était donc important de déterminer le rôle de ce co-récepteur dans la détection de la Listéria et nous avons pour ce faire utilisé des souris déficientes en CD14 (387).

Les tests préliminaires réalisés *in vitro* sur les macrophages dérivés de moelle osseuse déficients en CD14 ont montré que ces derniers avaient une production diminuée des cytokines inflammatoires TNF, IL-6 et IL-12p40. Bien que la production de NO soit altérée en l'absence du co-récepteur, nous n'avons pu observer qu'une légère augmentation de la charge bactérienne des macrophages CD14-/- comparativement aux macrophages sauvages trois heures après l'infection par Listéria. Par ailleurs, l'étude de la translocation nucléaire du facteur de transcription NF-κB par analyse confocale montre que ce mécanisme est altéré dans les macrophages CD14-/- stimulés par Listéria, confirmant la diminution de production des cytokines inflammatoires.

De plus, les souris déficientes en TLR2 et CD14 ont une résistance diminuée à l'infection par Listéria. Les animaux TLR4-/- présentent une survie comparable à celle des souris sauvages mettant ainsi en lumière l'association possible de CD14 avec TLR2 et non avec TLR4 dans la détection de la bactérie. Les animaux susceptibles présentent une charge bactérienne importante dans les organes majeurs de l'infection que sont le foie et la rate. Ce défaut de contrôle de la dissémination des bactéries est corrélé avec la présence de microabcès de taille importante et visibles en coupe histologique. En l'absence de CD14 ou de TLR2, l'organisme ne peut pas éliminer le pathogène. Le marquage immunohistochimique d'iNOS montre d'ailleurs un défaut d'activation de cette enzyme et l'analyse par cytométrie des macrophages du foie confirme un défaut d'activation des phagocytes.

En conclusion de ces travaux, il semble que CD14 participe avec TLR2 à la reconnaissance de Listéria. Cette détection est essentielle à la bonne mise en place de la réponse immnunitaire innée avec la production de cytokines inflammatoires et d'agents antimicrobiens afin de limiter la dissémination des bactéries dans l'organisme.

MAJOR ARTICLE

# CD14 Works with Toll-Like Receptor 2 to Contribute to Recognition and Control of *Listeria monocytogenes* Infection

**Laure Janot,[1,a] Thomas Secher,[1,a] David Torres,[1,a] Isabelle Maillet,[1] Josef Pfeilschifter,[2] Valerie F. J. Quesniaux,[1] Regine Landmann,[3] Bernhard Ryffel,[1] and François Erard[1]**

[1]University of Orléans and Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche (UMR 6218), Orléans, France; [2]Pharmacologie, University of Frankfurt, Germany; [3]Zentrum Lehre und Forschung, University Hospitals Basel, Switzerland

**Toll-like receptor 2 (TLR2) signaling has been shown to contribute to resistance to *Listeria monocytogenes* infection, as TLR2-deficient mice have a heightened susceptibility to infection with this organism. Because CD14 may associate with TLR2, we investigated the role of CD14 in *Listeria* responses. In both CD14-deficient and TLR2-deficient macrophages, nuclear factor κB translocation; CD40 and CD86; and the production of interleukin (IL)–12, IL-6, tumor necrosis factor, and nitric oxide are reduced. The absence of CD14 augmented susceptibility to *Listeria* infection, reduced survival, and diminished bacterial clearance, as observed in TLR2-deficient mice. Compared with C57BL/6 control mice, CD14-deficient mice were observed to have a greater number of hepatic microabscesses containing abundant neutrophils, these abscesses were larger in size, and there was reduced inducible nitric oxide synthase expression. Further, mice that are both CD14 deficient and TLR2 deficient display susceptibility to infection that is comparable to that of mice deficient in either CD14 or TLR2 alone. Therefore, the present data demonstrate the role of CD14 and TLR2 in the recognition and control of *Listeria* infection and host resistance.**

Toll-like receptors (TLRs) recognize a wide range of microbial pathogens, and their products modulate the innate immune response that may lead to inflammation and altered host defense [1–3]. We previously reported that TLR2 signaling can be shown to contribute to resistance to *Listeria monocytogenes* infection because TLR2-deficient mice have a higher susceptibility to infection with this organism [4]. The involvement of the TLR signaling pathway was further confirmed by the heightened susceptibility of myeloid differentiation primary response gene (88) (MyD88)–deficient mice [5, 6]. Having tested several other TLRs, such as TLR3, TLR4, and TLR9, by using gene-deficient mice, we concluded that they play no role in *Listeria*-induced immune activation (unpublished data), which emphasizes the role of TLR2 in the immune response to *Listeria*. Because TLR2 may associate with other membrane receptors for pathogen recognition, we asked whether CD14 might contribute to the TLR2-mediated response to *Listeria*.

Together with TLR4 and MD2, CD14 is critical for the recognition of lipopolysaccharide (LPS) and/or endotoxin from gram-negative bacteria by different host cells that initiate cell activation and the release of proinflammatory cytokines [7, 8]. CD14 is not an obligatory coreceptor of TLR4. Indeed, in LPS-induced, TLR4-mediated acute lung injury, CD14 is required in response to low doses of LPS but is less critical at higher doses of LPS [9]. CD14 may participate in MyD88-independent, Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adaptor inducing interferon-β–mediated and/or TIR domain-containing adaptor inducing interferon-β–related adaptor molecule–mediated signalling of rough LPS or lipid A [10]. CD14 is also involved in corecognition by TLR2 of various TLR ligands, such as peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumonia* [11] and hu-

Received 26 October 2006; accepted 20 November 2007; electronically published 5 May 2008.

Potential conflicst of interest: none reported.

Financial support: Fondation de la Recherche Medicale (to B.R.); French Ministry of Education (to L.J. and F.E.).

[a] L.J., T.S., and D.T. contributed equally to the work.

Reprints or correspondence: Bernhard Ryffel, Molecular Immunology and Embryology, 3B rue de la Ferollerie 45071 Orleans, France (bryffel@cnrs-orleans.fr).

**The Journal of Infectious Diseases 2008; 198:115–24**
© 2008 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.
0022-1899/2008/19801-0020$15.00
DOI: 10.1086/588815

man cytomegalovirus [12], and secreted microbial products from group B *Streptococcus* [13]; lipoteichoic acid–induced cell activation also depends on CD14 [14]. By using neutralizing antibodies to CD14 in TLR2-transfected CHO cells, the induction of tumor necrosis factor (TNF) production by killed *L. monocytogenes* was shown to depend, in part, on CD14 associated with TLR2 [15]. Typically, this is the case for the synthetic bacterial lipopeptide Pam3CSK4, signaling through heterodimers of TLR2 and TLR1, whereas diacylated Pam2CSK4, MALP2 or zymosan that signal through TLR2 and/or TLR6 require CD14 [10, 16]. CD14 may, however, participate to a lesser extent in signalling mediated by the TLR2-TLR6 complex than in signalling mediated by TLR4, because the TLR2-TLR6 complex was also shown to associate with CD36 [17]. Recently, activation of TLR3 has been shown to be enhanced by CD14, and an association of TLR3 and CD14 with the activating ligand has been demonstrated [18]. However, several TLR ligands recognize and activate cells independently of CD14.

In this study, we investigated whether CD14 participates in the host response to *Listeria* infection. There are a number of reasons to think that this is the case. First, CD14-deficient macrophages have a reduced proinflammatory response and reduced nitric oxide (NO) production. Second, CD14-deficient mice display diminished resistance to intravenous *Listeria* infection, similar to TLR2-deficient mice, and mice that are both TLR2 deficient and CD14 deficient are no more susceptible than mice deficient in either gene alone. Finally a role for TLR4 is excluded in this response. Therefore, the data suggest that CD14 is acting together with TLR2 to mount an efficient innate immune response to *Listeria*.

## METHODS

***Mice and infection.*** Mice 8–12 weeks old that were CD14 deficient (obtained from M.W Freeman [19]), TLR4 deficient [20], TLR2 deficient [21], TLR2 deficient and CD14 deficient (obtained from R. Landmann), or MyD88 deficient [22] and C57BL/6 control mice were used in this study. All mice were backcrossed for 10 generations onto the C57BL/6 background and bred under specific pathogen-free conditions at the Transgenose Institute (Centre National de la Recherche Scientifique). The animal experiments complied with the French government's ethical and animal experiment regulations. *L. monocytogenes* (L028 strain; Pasteur Institute) was cultured in LPS-free trypticase soy broth (soybean casein digest medium; Biovalley) and was aliquoted and stored in 30% glycerol at −80°C until use [4].

CD14-deficient mice, TLR2-deficient might, TLR4-deficient mice, CD14-deficient and TLR2-deficient mice, MyD88-deficient mice, and C57BL/6 control mice were injected in the caudal vein with $3 \times 10^4$ colony-forming units (cfu) per mouse. On days 2 and 3, livers and spleens were harvested. The organs were homogenized by use of a disposable homogenization system (Dispomix; Medictools AG), and the number of viable bacteria (colony-forming units) in the homogenates was determined by plating serial dilutions on trypticase soy broth agar plates (Biovalley) incubated at 37°C for 24 h as described elsewhere [4].

***Primary macrophage culture.*** Murine bone marrow cells were isolated from femurs and differentiated into macrophages after culturing $10^6$ cells/mL for 7 days in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Sigma) supplemented with 20% horse serum and 30% L929 cell-conditioned medium (as a source of macrophage colony-stimulating factor) [23]. Three days after washing and reculturing in fresh medium, the cell preparation contained a homogenous population of macrophages (>97% $CD11b^+$ cells). Bone marrow–derived macrophages (BMDMs) were plated in 96-well microtiter culture plates (at $10^5$ cells/well) by using serum-free DMEM (free of sCD14 and lipopolysaccharide-binding protein) with 100 U of interferon (IFN) $\gamma$ and stimulated with LPS (LPS of *Escherichia coli*, serotype O111:B4 [Sigma], at 100 ng/mL), and *L. monocytogenes* (at MOI 1:2, e.g., $2 \times 10^6$ cfu/mL). The viability of the macrophages as tested by trypan blue exclusion was not affected. After 6 h and 18 h of stimulation, the supernatants were harvested for cytokine determination.

***Cytokine and nitric oxide (NO) determination.*** TNF, interleukin (IL)–12p40, or IL-6 were quantified in cell-free supernatants from cell culture by use of commercial ELISA with a detection limit of 5 pg/mL (Duoset; R&D Systems). Nitrite ($NO_2-$; derived from NO breakdown) concentrations in supernatants from macrophages were determined by use of Griess reagent (1% sulphanilamide in 2.5% phosphoric acid, 0.1% n-1-napthylethylenediamide dichloric in 2.5% phosphoric acid [24]. After 30 min incubation at room temperature under agitation, the absorbance at 540 nm was measured. $NO_2-$ was quantified using sodium nitrite ($NaNO_2$) as a standard.

***Microscopic evaluation of liver tissue.*** Livers were fixed in 10% buffered formalin (Shandon). Tissues were dehydrated in ethanol and embedded in paraffin. Sections (3 $\mu$m) were cut and stained with haematoxylin and eosin for evaluation of pathologic changes. The number of microabscesses was quantified by counting in 20 microscopic fields at 100× magnification. The diameter of microabscesses was evaluated at 400× magnification by using an ocular grid, and 50 microabscesses were measured by 2 independent observers [4].

***NO synthase type 2 (NOS2) expression in paraffin-embedded sections of liver tissue.*** Paraffin-blocked tissue slides were rehydrated through xylene, 100% ethanol, 96% ethanol, and 70% ethanol to water. To unmask epitopes, sections were placed in citrate buffer, heated for 10 min in a microwave oven, and fixed for 10 min in acetone. Endogenous peroxidase activity was blocked by 1%

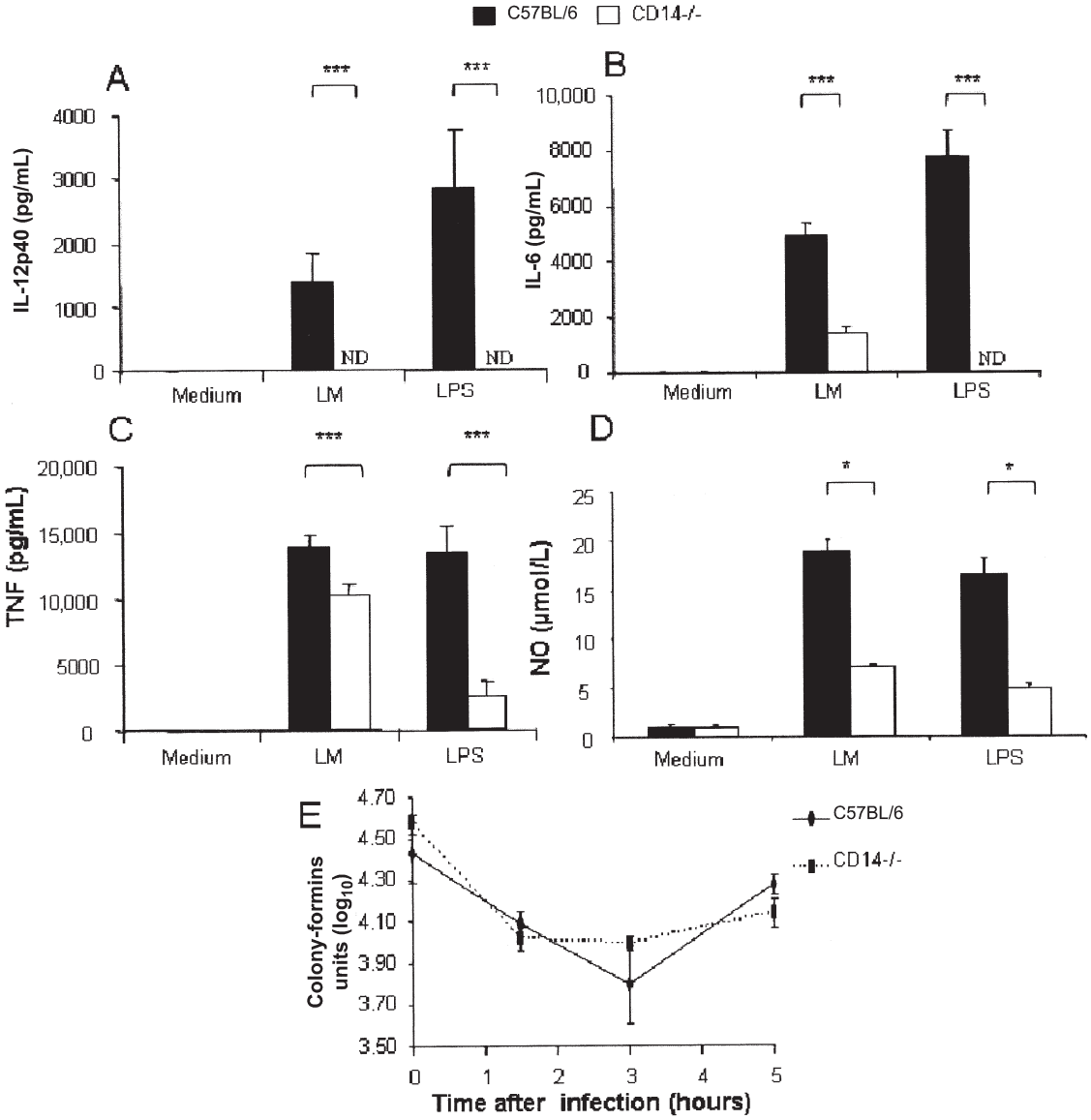



**Figure 1.** CD14-dependent production of proinflammatory cytokines in *Listeria monocytogenes* (LM)–infected bone marrow–derived macrophages (BMDMs). BMDMs from C57BL/6 control mice*(black bars)* and CD14-deficient (−/−) mice *(white bars)* were unstimulated (medium) or stimulated for 18 h with live *L. monocytogenes* (MOI, 1:2 [as described in the Methods section]) or lipopolysaccharide (LPS) (100 ng/mL). The concentrations of interleukin (IL)–12p40 *(A),* IL6 *(B),* tumor necrosis factor (TNF) *(C)* and nitric oxide (NO) *(D)* in the supernatant were determined by ELISA (for IL-12p40, IL-6, and TNF) and by the Griess method (for NO). Graphs show results of 1 experiment representative of 2 independent experiments, expressed as mean ± SD (*$P < .05$, ***$P < .001$). *E,* Bacteriocidal activity of macrophages from CD14−/− mice and C57BL/6 control mice assessed in vitro, as described in the Methods section. Graph shows results of 1 experiment representative of 2 independent experiments; number of viable bacilli are expressed as mean ± SD ($n = 4$). −/−, deficient; ND, not detectable.

$H_2O_2$ in methanol for 30 min, and endogenous biotin was blocked. Slides were incubated for 2 h at room temperature with the rabbit anti–mouse inducible nitric oxide synthase (NOS2) primary antibody (1:1000 dilution; supplied by J. Pfeilschifter), followed by incubation with biotinylated goat anti–rabbit antibody and revealed by use of the ABC Vector Kit for 30 min. Slides were washed and incubated for 10 min in fresh diaminobenzidine substrate. Sections were incubated for 2 min in 1% CuSO4, counterstained with haematoxylin, dehydrated through 70% ethanol, 96% ethanol, 100% ethanol to xylene and mounted in Eukitt (O.Kindler) for semiquantitative analysis by light microscopy.

***Flow cytometry analysis of macrophages and cells obtained from liver tissue.*** After stimulation, macrophages were harvested, washed once in PBS that contained 0.5% bovine serum albumin (BSA), and incubated on ice at $10^5$ cells/50 $\mu$L with primary antibodies (anti–CD40-PE [clone 3/23], anti–CD86–fluorescein isothiocyanate [FITC] [clone GL1], and anti–CD11b-PerCP Cy5.5 [clone M1/70]) for 20 min in the dark. All

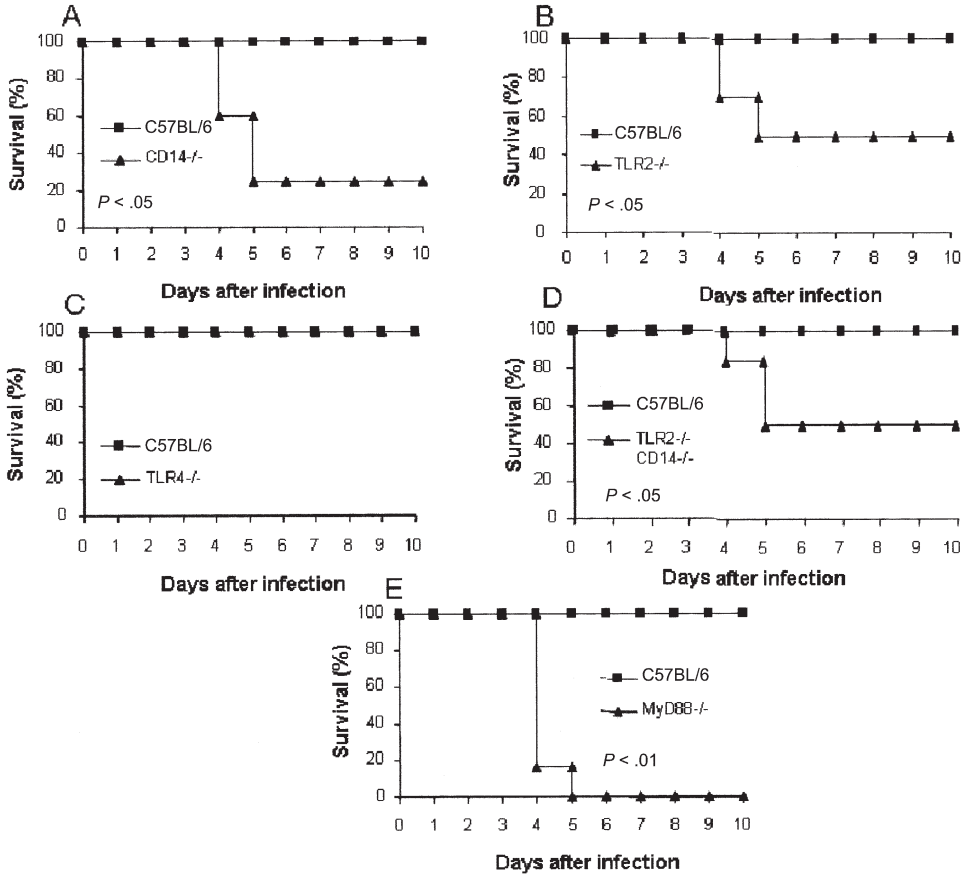



**Figure 2.** Reduced resistance of CD14-deficient (−/−) mice infected with *Listeria monocytogenes*. We injected $3 \times 10^4$ colony-forming units of *Listeria* intravenously into CD14−/− mice *(A)*, TLR2−/− mice *(B)*, TLR4−/− mice *(C)*, CD14−/− and TLR2−/− mice *(D)*, and MyD88−/− mice *(E)*. Survival rates were compared to that of C57BL/6-infected control mice during a 10-day period (for 6 mice per group). Graphs show results from 1 experiment representative of 2 independent experiments (*$P < .05$, **$P < .01$, determined by log rank test).

antibodies were obtained from BD Pharmingen. After washing with PBS that contained 0.5% BSA, cells were analyzed on a Becton Dickinson LSR analyzer.

For the flow cytometric analysis of inflammatory cells in the liver, mice were euthanized and the organs perfused with saline. Spleens and livers were minced with scissors, pressed through a nylon filter, resuspended in Percoll 33% gradient, and centrifuged at 1000 g for 20 min. Erythrocytes in the pellet were lysed with 155 mmol/L $NH_4Cl$, 10 mmol/L NaHCO3, and 0.1 mmol/L EDTA for 5 min on ice. Finally, the cells were resuspended in PBS that contained 0.5% BSA for fluorescence-activated cell sorter analysis using the protocol and antibodies described above.

***Nuclear translocation of nuclear factor κB (NF-κB) in macrophages.*** BMDMs were grown on microscopic slides in the presence of 10 U IFNγ overnight and then incubated with *L. monocytogenes* (MOI, 1:2) for 1h , washed with PBS, and then fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.5% Triton X-100. Macrophages were incubated with goat anti–murine NF-κBp65 mAb for 1 h at room temperature, washed and incubated with swine anti–goat IgG FITC (Sigma). The nuclear translocation of NF-κB was assessed by fluorescence microscopy and 200 cells per group were counted. The nuclear translocation was confirmed and documented by confocal microscopy (Leica SP2).

***Macrophage killing assay.*** The bactericidal activity of macrophages was determined as described elsewhere [25]. In brief, cells were plated in 24-well tissue culture plates ($10^6$ cells/well) in the presence of 100 U IFNγ overnight and then exposed to *L. monocytogenes* (MOI, 1:2 [e.g., $10^6$ cells/mL per $2 \times 10^6$ cfu/mL]). After 30 min incubation at 37°C, gentamycin (10μg/mL) was added, and the cells were harvested immediately or after incubation periods of 1.5 h, 3 h, and 5 h and washed 3 times (each wash was with 1 mL of DMEM that contained 10% fetal calf serum). The supernatant was plated at 10-fold dilutions on trypticase soy broth (Biovalley), as described above. The plates were incubated at 37°C, and the number of colony-forming units was enumerated after 24 h.

***Statistical analysis.*** The statistical evaluation of differences between the experimental groups was performed by the use of the log rank test for survival studies and the Student's t test.

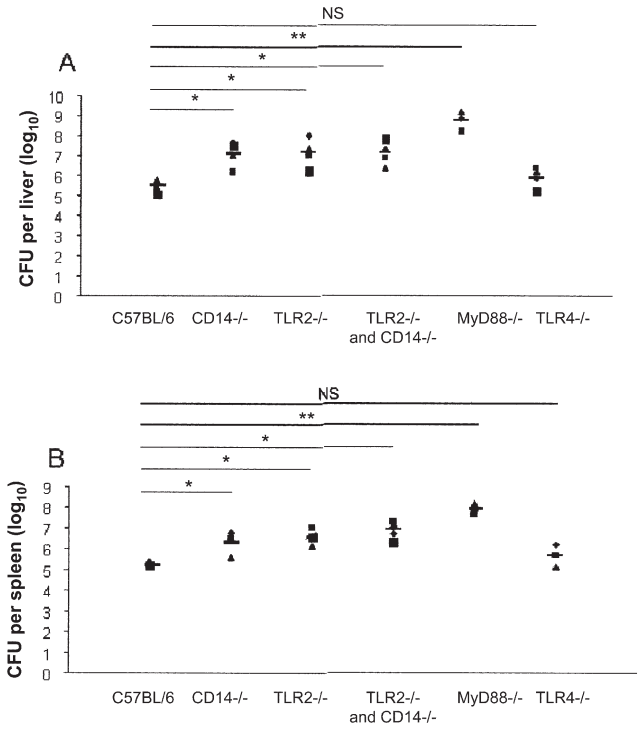



**Figure 3.** Reduced rate of bacterial clearance from the liver and spleen of CD14-deficient mice infected with *Listeria monocytogenes*. Bacterial load in the liver *(A)* and spleen *(B)* of CD14-deficient (−/−) mice, TLR2−/− mice, CD14 −/− and TLR2−/− mice, TLR4−/− mice, MyD88−/− mice, and C57BL/6 control mice 3 days after infection with $3 \times 10^4$ colony-forming units of *L. monocytogenes* (4 per group). Each symbol indicates the liver or spleen of 1 mouse. Results are from 1 experiment representative for 2 independent experiments and are expressed as mean ± SD (*$P < .05$, **$P < .01$. NS, not significant.

## RESULTS

***Reduced production of IL-12p40, IL-6, TNF, and NO in CD14–deficient macrophages stimulated by* Listeria.** To characterize the role of CD14 for proinflammatory cytokine production in response to *L. monocytogenes*, primary bone marrow–derived macrophages from CD14-deficient mice and C57BL/6 control mice were stimulated with *L. monocytogenes*. The production of IL-12p40, IL-6, and, to a lesser extent, TNF was significantly reduced after *L. monocytogenes* activation of CD14-deficient macrophages at 6 h (not shown) and 18 h (figures 1*A*–1*C*), compared with cells from control mice, without affecting the cells' viability. As expected, the cytokine responses to low doses of LPS were abrogated in CD14-deficient macrophages (figure 1), as was also seen in TLR4-deficient macrophages (not shown). A similar reduction in cytokine production in response to *L. monocytogenes* infection is seen in TLR2-deficient and MyD88-deficient macrophages, as reported elsewhere [4].To explore the potential mechanisms of a bactericidal effect, we measured NO production. Macrophages from CD14-deficient mice produced less NO in response to *L. monocytogenes* infection, compared with macrophages from control mice (figure 1*D*) ($P < .05$). Despite diminished NO production, there was no significant reduction of bacterial killing by macrophages from CD14-deficient mice (figure 1*E*) ($P > .05$).

Therefore, the data suggest that CD14 is involved in *L. monocytogenes*–induced macrophage activation. In view of the reduced proinflammatory cytokine and NO production, we hypothesized that host resistance to infection with this intracellular pathogen may be diminished in CD14-deficient mice.

***Reduced resistance and bacterial clearance in* Listeria*-infected, CD14-deficient mice.*** Because *L. monocytogenes* activates macrophages in a CD14-dependent and TLR2-dependent manner, we asked whether the CD14 engagement contributes to TLR2-dependent resistance to an in vivo *L. monocytogenes* infection. We compared the resistance of C57BL/6 control mice and CD14-deficient mice to a systemic injection of *L. monocytogenes*. Intravenous infection with $3 \times 10^4$ cfu per mouse caused death in 60% of CD14-deficient mice within 5 days, whereas all control mice survived (figure 2*A*). TLR2-deficient mice display a similar susceptibility to infection, whereas TLR4-deficient mice are resistant (figures 2*B* and 2*C*). To test whether there was an additive effect when both CD14 and TLR2 genes were inactivated, we used mice that were both CD14 deficient and TLR2 deficient; their susceptibility to *L. monocytogenes* infection was comparable to that of single gene–deficient mice (figure 2*D*). In contrast, we confirm that MyD88-deficient mice are highly sensitive to *L. monocytogenes* infection (figure 2*E*), as we reported before [6]. Therefore, these data clearly show that CD14-deficient mice have heightened susceptibility to *L. monocytogenes* infection.

In view of their increased sensitivity to infection with this organism, we asked whether the rate of bacterial clearance might be reduced in CD14-deficient mice. The bacterial load in spleen and liver tissue from control and CD14-deficient mice that had been infected with $3 \times 10^4$ cfu of *L. monocytogenes* per mouse was analyzed. Three days after infection, CD14-deficient mice displayed ~2 log higher levels of colony-forming units in the liver and 1 log higher levels in the spleen, compared with wild-type control mice, and MyD88-deficient mice had significantly higher levels than control mice (figures 3*A* and 3*B*). TLR2-deficient mice and mice deficient in both CD14 and TLR2 displayed an increase in the number of viable bacteria in the liver and spleen that was comparable to that seen in mice that lacked CD14 expression alone, without evidence of an additive effect (figure 3). Therefore, reduced host resistance in the absence of CD14 and/or TLR2 is associated with a significant increase of bacilli in the liver. As consequence of the higher bacterial load, augmented inflammation with an increased number of hepatic microabscesses was expected.

***Augmented hepatic inflammatory response in* Listeria*-infected, CD14-deficient mice.*** Microscopic examination of liver tissue at low magnification revealed distinct differences in

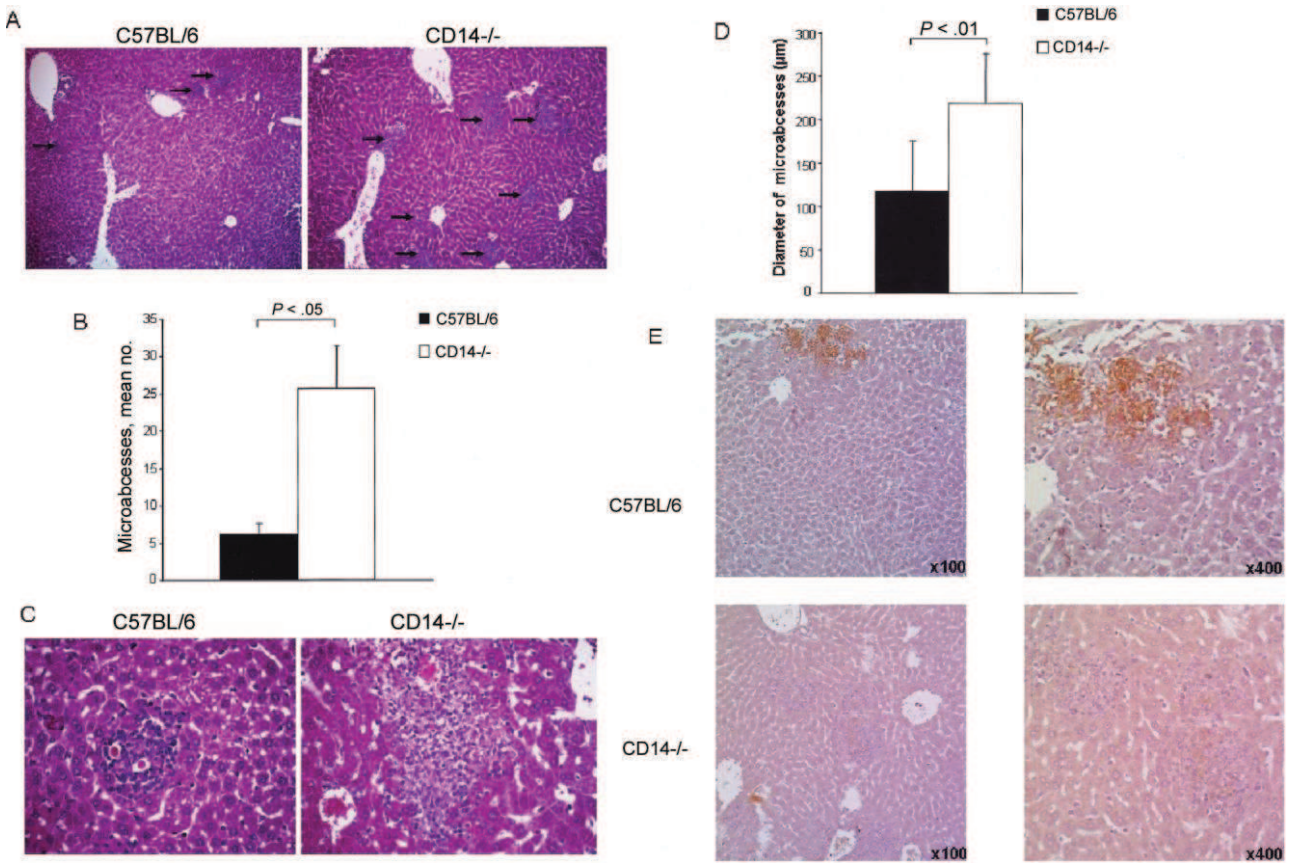



**Figure 4.** More abundant and larger hepatic microabscesses observed in CD14-deficient (−/−) mice. C57BL/6 and CD14−/− mice were infected with $3 \times 10^4$ colony-forming units of *Listeria monocytogenes* and liver tissue was histologically examined 3 days after infection (4 mice per group). Sections of liver tissue showing small, confined microabscesses in wild-type mice and spreading infection in CD14−/− mice *(A)* (hematoxylin and eosin staining, ×100). Increased numbers of microabscesses in CD14−/− mice, compared with C57BL/6 controls *(B)*. Histological sections of liver tissue showing small, confined microabscesses in wild-type mice and spreading infection in CD14−/− mice *(C)* (hematoxylin and eosin staining, ×400). *D,* Mean diameter of microabscesses in millimeters. Graphs show results from 1 experiment representative of 2 independent experiments expressed as mean ± SD (*$P < .05$, **$P < .01$). *E,* Reduced expression of inducible nitric oxide synthase in the liver of CD14−/− mice. Immunostaining was performed at 3 days after infection in C57BL/6 control mice and CD14−/− mice by immunohistochemical analysis (×100 and ×400) ($n = 4$).

the hepatic microabscesses observed in CD14-deficient mice, compared with those observed in C57BL/6 control mice (figure 4*A*) 3 days after infection. The hepatic microabscesses in CD14-deficient mice were generally larger, less confined, and partially confluent. The number of abscesses was significantly increased in CD14-deficient mice (figure 4*B*). Moreover, the microabscesses in these mice had less-defined boundaries, contained more abundant neutrophils and necrotic tissue (figure 4*C*), and were larger (figure 4*D*), compared with the abscesses observed in control mice. Further, as an indicator of reduced phagocyte activation and bactericidal activity in vivo, NOS2 expression in infected liver tissue was clearly reduced in CD14-deficient mice, compared with control mice (figure 4*E*). Therefore, the absence of CD14 is associated with reduced NOS2 expression, enhanced neutrophil recruitment, and formation of large microabscesses in the liver.

Flow cytometric analysis of the inflammatory cells in the liver at 2 days after infection, when the bacterial loads are comparable between the experimental groups (data not shown), revealed decreased expression of CD40 by $CD11b^+$ cells from CD14-deficient mice, compared with cells from C57BL/6 control mice, which suggested reduced activation of monocytes and/or macrophages in the liver (figure 5). In contrast, the number of $Gr1^+$ neutrophils is slightly increased at the same time point (not shown), as shown by microscopic examination of the tissue sections.

***CD14- and TLR2-dependent activation of NF-κB and co-stimulatory molecules.*** To further dissect potential crosstalk between the TLR2 and CD14 receptor pathways, we assessed the translocation of cytosolic NF-κB into the nucleus in BMDMs at several time points after *L. monocytogenes* infection. Although uninfected macrophages from control mice did not show any significant nuclear staining, incubation with *L. monocytogenes* induced rapid nuclear translocation of NF-κB in macrophages from C57BL/6 mice, which reached a maximum at 1 h with 64% of macrophages showing nuclear staining. In contrast, nuclear

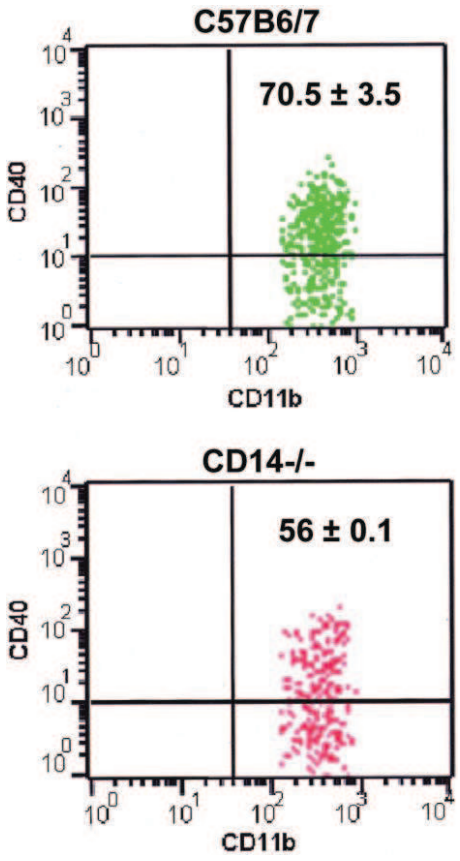



**Figure 5.** CD14-dependent recruitment and activation of macrophages in the liver. CD14-deficient mice and control mice were infected with $3 \times 10^4$ colony-forming units of *Listeria monocytogenes,* and mononuclear cells from the liver were isolated 2 days after infection (4 mice per group). The cells were stained with CD11b and CD40 and analyzed by flow cytometry. Numbers are the percentage of double-positive cells in the mononuclear cell population. Graphs show results from 1 experiment that are representative of 2 independent experiments, expressed as mean ± SD ($n = 2$).

translocation was absent in macrophages from CD14-deficient or TLR2-deficient mice after *L. monocytogenes* infection (figure 6*A*). Therefore, *L. monocytogenes* induced NF-κB activation through CD14 and TLR2 with similar kinetics and magnitude. Further, reduced NF-κB activation was found to be associated with diminished upregulation of CD40 and CD86 expression in macrophages from CD14-deficient mice and TLR2-deficient mice infected with *L. monocytogenes,* compared with macrophages from control mice (figure 6*B*). Therefore, both NF-κB and costimulatory molecule expression are reduced to a similar extent in macrophages from CD14-deficient mice or TLR2-deficient mice. The data suggest that CD14 and TLR2 sense molecular patterns expressed by *L. monocytogenes* in concert. Reduced macrophage activation, cytokine production, and NO production may explain reduced in vivo host responses with diminished rates of bacterial clearance and enhanced inflammation observed in CD14-deficient mice and TLR2-deficient mice.

## DISCUSSION

The present data demonstrate for the first time, to our knowledge, that CD14-deficient mice have an increased sensitivity to *L. monocytogenes* infection with reduced survival rates due to impaired activation and killing of phagocytes that results in reduced rates of bacterial clearance and augmented inflammatory pathology. In fact, in macrophages stimulated by *L. monocytogenes,* the production of IL-12p40, IL-6, NO, and, to a lesser extent, TNF that depends in part on TLR2 signaling, but not on TLR4 signaling, is reduced. These results are in agreement with those of Flo et al., who demonstrated that CD14 neutralization reduced TNF production in TLR2-transfected CHO cells activated by heat killed *L. monocytogenes* [15]. In the present study, we show that cytokine and NO production by primary macrophages stimulated with live *L. monocytogenes* is dependent on CD14 and TLR2 [4]. In addition, the nuclear translocation of NF-κB and expression of the costimulatory molecules CD40 and CD86 are diminished in the absence of either of CD14 or TLR2. In conformity with our results, reduced cytokine production in macrophages from TLR2-deficient mice has been shown [26] and reduced serum levels of IFNγ, TNF, and IL-12 have been reported in these mice [5]. Furthermore, we extend this observation and demonstrate a role for CD14 in in vivo *Listeria* infection. Reduced resistance to *Listeria* infection is seen in both CD14-deficient and TLR2-deficient mice. Moreover, mice deficient in CD14 or TLR2 alone and mice deficient in both CD14 and TLR2 display comparable reduction in host resistance, with increased of bacterial load and enhanced acute hepatic inflammation. The discrepancy between the susceptibility reported previously in TLR2-deficient mice [6, 27] and our data here may be explained by different routes of infection (intraperitoneal versus intravenous), the number of backcrosses of the mice, and the strains of *Listeria* used.

The involvement of CD14 agrees well with our unpublished data that suggest *L. monocytogenes* signals through TLR2-TLR6 complexes. Indeed, ligands of TLR2-TLR6 heterodimers, such as Pam2CSK4, MALP2 or zymosan, seem to require CD14, whereas ligands of TLR2-TLR1 heterodimers, such as Pam3CSK4, bind and signal independently of CD14 [1, 28, 29]. It should be emphasized that the MyD88-deficient mice are distinctly more susceptible to *L. monocytogenes* infection than TLR2-deficient or CD14-deficient mice (figure 2*D*). Previously, a high sensitivity to *Listeria* infection was reported for MyD88-deficient mice, but interestingly, an adaptive immune response with protective immunity was obtained in the absence of MyD88 [30]. MyD88 is further involved in crosstalk with other pathways such as the focal adhesion kinase [31] that may play a role in the

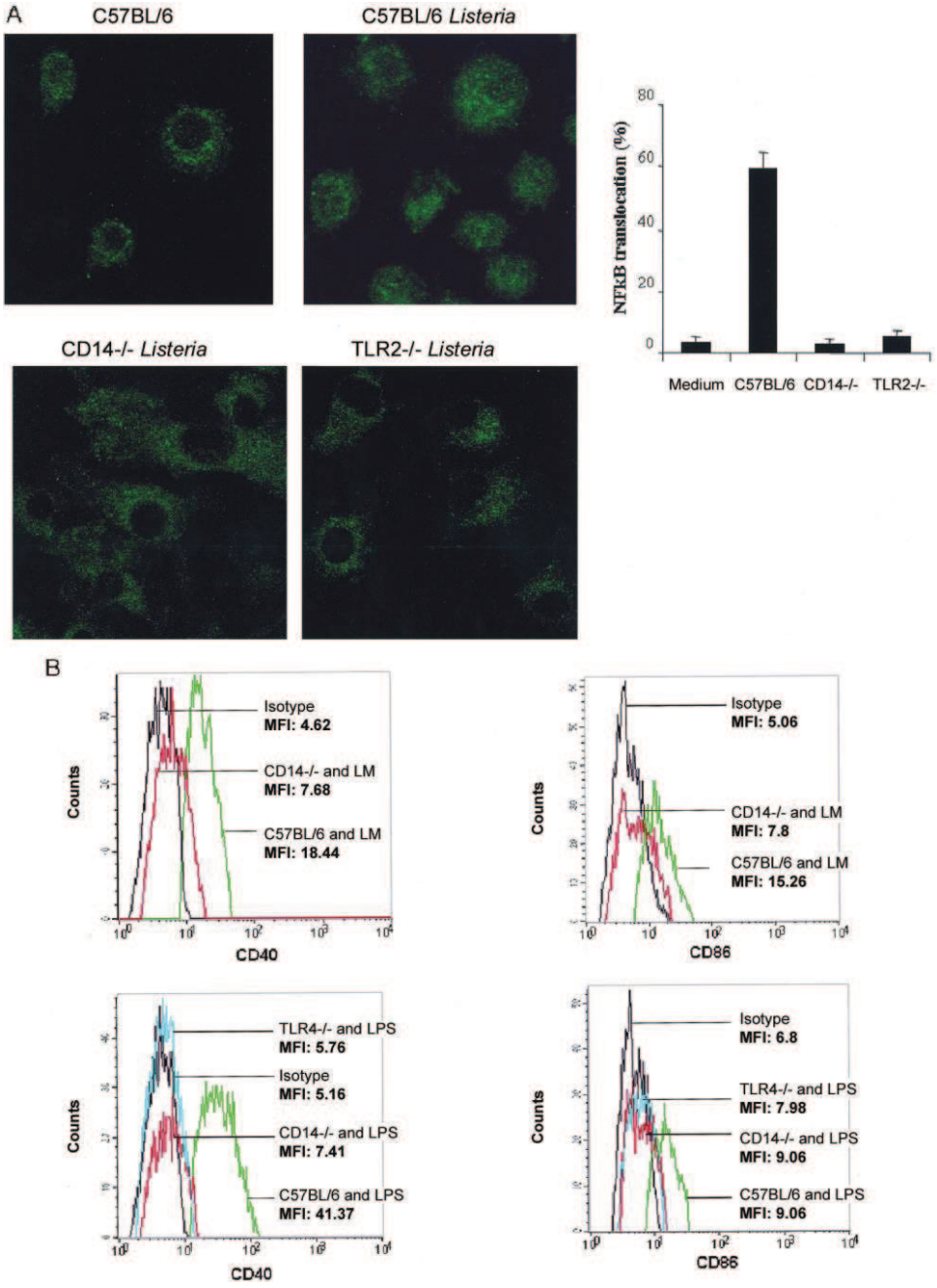



**Figure 6.** CD14-dependent nuclear factor κB (NF-κB) translocation and upregulation of CD40 and CD86 expression in *Listeria monocytogenes* (LM)–infected bone marrow–derived macrophages (BMDMs). NF-κB translocation in *L. monocytogenes*–infected macrophages *(A).* BMDMs from C57BL/6 mice and CD14-deficient mice were stimulated for 1h with *L. monocytogenes* (MOI, 1:2), and NF-κB staining was assessed. A quantitative evaluation of the percentage of cells showing NF-κB translocation is presented here as a bar graph. Reduced upregulation of CD40 and CD86 expression *(B)* in CD14-deficient macrophages after *L. monocytogenes* or lipopolysaccharide (LPS) stimulation (2 mice per group). Graphs show results from 1 experiment representative of 3 independent experiments. Counts represent the relative cell number. MFI, mean fluorescence intensity.

process of spreading *Listeria* infection. CD14 has so far not been reported to be involved in receptor complexes other than TLR4 and TLR2, with the exception of TLR3. A TLR3 ligand polyinositine-cytosine analogue has been shown to activate antigen-presenting cells in a TLR3- CD14 dependent manner, and a ligand- TLR3-CD14 complex has been demonstrated [18].

CD14 seems to be involved in regulating neutrophil influx, because CD14-deficient mice show increased expression of CXCR2, MIP2, and neutrophil transmigration in pneumococcal infection [32], whereas neutrophil migration was delayed in CD14-deficient mice early after peritoneal infection with *Salmonella,* acting through TLR4 [33]. Here, neutrophil recruitment

after *L. monocytogenes* infection is enhanced, resulting in large, diffuse microabscesses in the liver of CD14-deficient mice. However, the data suggest that macrophages and neutrophils from CD14-deficient mice and TLR2-deficient mice may be less effective in killing in vivo, as indicated by reduced iNOS expression in the liver, although the macrophage mediated killing was not reduced in vitro. Reactive nitrogen is a key bactericidal mechanism for mycobacteria [34] and *Listeria* [35]. However, the killing of *Listeria* is further supported by reactive oxygen produced by phagocytes oxidase ($pg91^{phox}$). In fact, mice that are double-deficient for $pg91^{phox}$ and NOS2 are more susceptible to *Listeria* infection [35] than single-deficient mice, but the existence of alternative mechanisms of killing is discussed [36].

Although we showed reduced resistance in TLR2-deficient mice [5, 6] and CD14-deficient mice, the dramatically heightened susceptibility of MyD88-deficient mice that has bee described before [5, 6] cannot be solely ascribed to defective TLR sensing of *L. monocytogenes*. We have tested most of the TLRs by using single-gene deficient mice (data not shown), suggesting that TLR2-CD14 may contribute to this heightened susceptibility, along with other non-TLR pathogen recognition receptors on the membrane, which are yet to be identified.

Previous investigations demonstrated the induction of MCP-1 in macrophages by *L. monocytogenes* and CCR2-dependent recruitment and activation of monocytes [27]. The induction of MCP-1 was found to be MyD88-dependent and TLR2-independent. Edelson et al. [6] offer data that reinforce the MyD88-dependent control of *L. monocytogenes* infection, suggesting a contribution by IL-1 and IL-18 receptor pathways, which depend on TLR signaling on the MyD88 adapter protein. This hypothesis is further reinforced by reduced IL-1 production in *L. monocytogenes*–infected, ASC-deficient macrophages [26]. Therefore, TLR2-CD14 and additional, undefined pattern recognition receptors induce IL-1 and IL-18, which are required, together with IFN$\gamma$, IL-1, and TNF, to control *L. monocytogenes* infection. However, a recent report demonstrated that IL-1 signaling is dispensable for the control of systemic *Listeria* infection, but required to control cerebral listeriosis [37].

In conclusion, *Listeria* activates macrophages in vitro in a CD14-dependent and/or TLR2-dependent manner. CD14 expression is required for host resistance to *L. monocytogenes* infection in vivo; reduced CD14 expression results in bacterial persistence, reduced NOS2 expression in the liver, and heightened mortality. However, there is no additive effect with TLR2; mice deficient in both CD14 and TLR2 have comparably heightened susceptibility to *Listeria* infection.

## References


1. Akira S. Toll-like receptor signaling. J Biol Chem **2003**; 278:38105–8.
2. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. Annu Rev Immunol **2002**; 20:197–216.
3. Medzhitov R, Janeway C, Jr. The Toll receptor family and microbial recognition. Trends Microbiol **2000**; 8:452–6.
4. Torres D, Barrier M, Bihl F, et al. Toll-like receptor 2 is required for optimal control of *Listeria monocytogenes* infection. Infect Immun **2004**; 72:2131–9.
5. Seki E, Tsutsui H, Tsuji NM, et al. Critical roles of myeloid differentiation factor 88-dependent proinflammatory cytokine release in early phase clearance of *Listeria monocytogenes* in mice. J Immunol **2002**; 169: 3863–8.
6. Edelson BT, Unanue ER. MyD88-dependent but Toll-like receptor 2-independent innate immunity to *Listeria:* no role for either in macrophage listericidal activity. J Immunol **2002**; 169:3869–75.
7. Ulevitch RJ, Tobias PS. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. Annu Rev Immunol **1995**; 13:437–57.
8. Ulevitch RJ, Tobias PS. Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. Curr Opin Immunol **1999**; 11: 19–22.
9. Jeyaseelan S, Chu HW, Young SK, Freeman MW, Worthen GS. Distinct roles of pattern recognition receptors CD14 and Toll-like receptor 4 in acute lung injury. Infect Immun **2005**; 73:1754–63.
10. Jiang Z, Georgel P, Du X, et al. CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. Nat Immunol **2005**; 6:565–70.
11. Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R, Golenbock D. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. J Immunol **1999**; 163:1–5.
12. Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, et al. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. J Virol **2003**; 77:4588–96.
13. Henneke P, Takeuchi O, van Strijp JA, et al. Novel engagement of CD14 and multiple toll-like receptors by group B streptococci. J Immunol **2001**; 167:7069–76.
14. Ellingsen E, Morath S, Flo T, et al. Induction of cytokine production in human T cells and monocytes by highly purified lipoteichoic acid: involvement of Toll-like receptors and CD14. Med Sci Monit **2002**; 8: BR149–56.
15. Flo TH, Halaas O, Lien E, et al. Human Toll-like receptor 2 mediates monocyte activation by *Listeria monocytogenes,* but not by group B streptococci or lipopolysaccharide. J Immunol **2000**; 164:2064–9.
16. Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, et al. CD36 is a sensor of diacylglycerides. Nature **2005**; 433:523–7.
17. Hoebe K, Janssen E, Beutler B. The interface between innate and adaptive immunity. Nat Immunol **2004**; 5:971–4.
18. Lee HK, Dunzendorfer S, Soldau K, Tobias PS. Double-stranded RNA-mediated TLR3 activation is enhanced by CD14. Immunity **2006**; 24: 153–63.
19. Moore KJ, Andersson LP, Ingalls RR, et al. Divergent response to LPS and bacteria in CD14-deficient murine macrophages. J Immunol **2000**; 165:4272–80.
20. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the LPS gene product. J Immunol **1999**; 162:3749–52.
21. Werts C, Tapping RI, Mathison JC, et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. Nat Immunol **2001**; 2:346–52.
22. Adachi O, Kawai T, Takeda K, et al. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. Immunity **1998**; 9:143–50.
23. Muller M, Eugster HP, Le Hir M, et al. Correction or transfer of immunodeficiency due to TNF-LT alpha deletion by bone marrow transplantation. Mol Med **1996**; 2:247–55.
24. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. Anal Biochem **1982**; 126:131–8.
25. Fields PI, Swanson RV, Haidaris CG, Heffron F. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. Proc Natl Acad Sci U S A **1986**; 83:5189–93.

26. Ozoren N, Masumoto J, Franchi L, et al. Distinct roles of TLR2 and the adaptor ASC in IL-1beta/IL-18 secretion in response to *Listeria monocytogenes*. J Immunol **2006**; 176:4337–42.
27. Serbina NV, Kuziel W, Flavell R, Akira S, Rollins B, Pamer EG. Sequential MyD88-independent and -dependent activation of innate immune responses to intracellular bacterial infection. Immunity **2003**; 19:891–901.
28. Beutler B. TLR4 as the mammalian endotoxin sensor. Curr Top Microbiol Immunol **2002**; 270:109–20.
29. Cleveland MG, Gorham JD, Murphy TL, Tuomanen E, Murphy KM. Lipoteichoic acid preparations of gram-positive bacteria induce interleukin-12 through a CD14-dependent pathway. Infect Immun **1996**; 64:1906–12.
30. Way SS, Kollmann TR, Hajjar AM, Wilson CB. Cutting edge: protective cell-mediated immunity to *Listeria monocytogenes* in the absence of myeloid differentiation factor 88. J Immunol **2003**; 171:533–7.
31. Zeisel MB, Druet VA, Sibilia J, Klein JP, Quesniaux V, Wachsmann D. Cross talk between MyD88 and focal adhesion kinase pathways. J Immunol **2005**; 174:7393–7.
32. Echchannaoui H, Frei K, Letiembre M, Strieter RM, Adachi Y, Landmann R. CD14 deficiency leads to increased MIP-2 production, CXCR2 expression, neutrophil transmigration, and early death in pneumococcal infection. J Leukoc Biol **2005**; 78:705–15.
33. Yang KK, Dorner BG, Merkel U, et al. Neutrophil influx in response to a peritoneal infection with *Salmonella* is delayed in lipopolysaccharide-binding protein or CD14-deficient mice. J Immunol **2002**; 169:4475–80.
34. MacMicking JD, Nathan C, Hom G, et al. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. Cell **1995**; 81:641–50.
35. Shiloh MU, MacMicking JD, Nicholson S, et al. Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. Immunity **1999**; 10:29–38.
36. Fehr T, Schoedon G, Odermatt B, et al. Crucial role of interferon consensus sequence binding protein, but neither of interferon regulatory factor 1 nor of nitric oxide synthesis for protection against murine listeriosis. J Exp Med **1997**; 185:921–31.
37. Deckert M, Virna S, Sakowicz-Burkiewicz M, et al. Interleukin-1 receptor type 1 is essential for control of cerebral but not systemic listeriosis. Am J Pathol **2007**; 170:990–1002.

**Article 2:** Membrane Tumor Necrosis Factor Confers Partial Protection to *Listeria* Infection.

David Torres, Laure Janot, Valérie F.J. Quesniaux, Sergei I. Grivennikov, Isabelle Maillet, Jonathon D. Sedgwick, Bernhard Ryffel and François Erard. American Journal of Pathology, 2005:167.

**Article 3:** Dominant-Negative Inhibitor of Soluble TNF Attenuate Experimental Arthritis Without Suppressing Innate Immune Response

Jonathan Zalevsky, Thomas Secher, Serguei A. Ezhevsky, Laure Janot, Paul M. Steed Christopher O'Brien, Araz Eivazi, James Kung, Duc-Hanh T. Nguyen, Stephen K. Doberstein, François Erard, Bernhard Ryffel and David E. Szymkowski. The Journal Of Immunology, 2007:179

---

La réponse immunitaire innée dans l'infection par *Listeria monocytogenes* fait intervenir de nombreuses cellules telles que les macrophages ou les neutrophiles afin de limiter la croissance bactérienne. Les leucocytes sont à l'origine de la synthèse de cytokines inflammatoires et je me suis intéressée particulièrement à l'implication du TNF dans cette infection microbienne.

Exprimé par un large éventail de cellules, le TNF est connu pour être le médiateur principal de l'inflammation et permet le recrutement de phagocytes sur le lieu de l'infection. Cette cytokine est d'abord produite sous la forme d'une protéine membranaire, le Mem-TNF. La TNF-a converting enzyme (TACE) clive le TNF membranaire afin de libérer sa forme soluble homotrimérique (23, 24). Le TNF joue un rôle majeur dans la réponse à certaines infections comme par *Mycobacterium tuberculosis* ou *Listeria monocytogenes* (38, 388). S'il est bien connu que le TNF soluble est important dans la mise en place de la réponse antibactérienne, la contribution du Mem-TNF est en revanche peu étudiée.

Différents travaux ont mis en évidence le rôle du TNF dans la réponse contre Listéria et nous nous sommes donc intéressés à l'implication du TNF membranaire dans la réponse à cette infection. Le Mem-TNF est décrit comme fonctionnel dans l'activation polyclonale des cellules B ou dans l'induction de la production d'IL-10 par les monocytes (31, 41, 42). Des études ont montré que ce TNF membranaire participe au contrôle de l'infection par Listéria et de M. *tuberculosis* (389-391). Cependant, ces résultats ont

été obtenus par des études sur des souris exprimant le transgène du Mem-TNF en multiple copies sur fond déficient en TNF et en lymphotoxine. Il en résulte une expression peu physiologique de cette protéine car relativement élevée. Ces raisons ont poussé Sedgwick à générer des souris dites Knock In comportant une mutation ponctuelle au niveau du site de clivage réalisé par la TACE, ce qui empêche le clivage du Mem-TNF en sTNF (392).

La création de ces souris nous a donc permis d'étudier plus précisément le rôle du TNF membranaire dans l'infection par Listéria. Nos résultats sur des cultures de cellules primaires montrent que les macrophages Mem-TNF présentent un phénotype se rapprochant de celui des cellules sauvages. L'étude de la survie des animaux indique que le Mem-TNF est capable de protéger les souris infectées par des « doses modérées » de Listéria. La charge bactérienne des organes est intermédiaire à celle des souris sauvages et TNF-/-, montrant bien la protection partielle conférée par le TNF membranaire. Les coupes histologiques ainsi que les études immunohistochimiques du foie des animaux infectés ont permis de montrer que le Mem-TNF permet le recrutement des neutrophiles sur le site de l'inflammation.

Par ailleurs, les analyses sanguines révèlent que l'infection par Listéria induit, chez les souris sauvages et Mem-TNF, une élévation puis une baisse du nombre de neutrophiles. Cette neutropénie n'est que transitoire sauf pour les souris TNF-/-. De plus, la forme membranaire du TNF permet aux animaux de reformer leur stock de lymphocytes alors que les souris TNF-/- présentent une lymphopénie. Le transfert adoptif de cellules spléniques provenant de souris Mem-TNF immunisées avec une souche de Listéria déficiente en Actine A montre que la présence de la forme membranaire du TNF sur les lymphocytes protège les souris receveuses TNF-/- de l'infection.

Nos travaux démontrent que le TNF membranaire participe activement à la médiation cellulaire durant la réponse à l'infection par Listéria. Ces résultats prennent d'autant plus d'importance si l'on se place dans le cadre des thérapies anti-TNF développées dans les maladies inflammatoires comme la maladie de Crohn ou l'arthrite rhumatoïde. En effet, le traitement de ces maladies repose sur la prise de médicaments anti-TNF comme l'infliximab, un anticorps monoclonal contre le TNF, ou l'étanercept qui est une protéine de fusion entre le fragment Fc de l'immuoglobuline IgG1 et le TNFR2.

Ces médicaments sont efficaces mais ont quelques effets secondaires comme l'affaiblissement du système immunitaire et les patients sont susceptibles à certaines infections opportunistes comme la listériose ou la tuberculose (393, 394). Cette première génération de médicament base son action sur la neutralisation des formes membranaires et solubles du TNF. L'étude des effets du Mem-TNF permet d'envisager des traitements alternatifs qui neutralisent uniquement le TNF souble et qui préservent l'action du TNF membranaire.

La création du Dominant-Negatif du TNF (DN-TNF) s'inscrit dans cette optique. En collaboration avec la société américaine Xencor, nous avons pu tester ce produit dans l'infection par Listéria. Le DN-TNF repose sur la création de monomères du TNF comportant des mutations autorisant les échanges des sous-unités avec le sTNF natif. Les homotrimères ou hétérotrimères ainsi formés se fixent sur les récepteurs TNFR1 et TNFR2 mais ne peuvent les activer (56). Dans ce cas, seul le TNF soluble est neutralisé, laissant le Mem-TNF intègre.

Plusieurs DN-TNF ont été créés et chacun a été testé *in vitro* dans sa capacité à inhiber l'activation des caspases ou la production d'IL-8 par le sTNF dans des lignées humaines et murines. Leur rôle d'inhibiteur spécifique du sTNF est confirmé *in vivo* dans le traitement de deux modèles d'arthrite induite par des anticorps anti-collagène ou par le collagène lui-même (Collagene Ab-Induced Arthritis et Collagen-Induced Arthritis).

Nous avons testé deux de ces dominant-négatifs du TNF (XENP1595 et XENP345) dans notre modèle d'infection par Listéria, d'abord sur des souris sauvages C57/BL6, puis sur des souris Mem-TNF. Il s'avère que ces deux protéines, contrairement à l'étanercept, n'ont qu'un effet limité sur l'immunité des souris sauvages puisqu'elles permettent une survie équivalente à celle des souris Mem-TNF ainsi qu'une charge bactérienne limitée dans les organes. De plus, les deux types de DN-TNF testés sur les souris Mem-TNF infectées n'ont aucun effet sur l'immunité innée montrant ainsi leur spécificité d'action et ce même en l'absence de TNF soluble.

American Journal of Pathology, Vol. 167, No. 6, December 2005
Copyright © American Society for Investigative Pathology

*Immunopathology and Infectious Diseases*

# Membrane Tumor Necrosis Factor Confers Partial Protection to *Listeria* Infection

David Torres,* Laure Janot,*
Valerie F.J. Quesniaux,* Sergei I. Grivennikov,*†
Isabelle Maillet,* Jonathon D. Sedgwick,‡
Bernhard Ryffel,* and Francois Erard*§

*From the Transgenose Institute,* Centre National de la Recherche Scientifique, Molecular Immunology and Embryology, Orléans, France; the Laboratory of Molecular Immunology,† Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow, Russia; DNAX Research Incorporated,‡ Palo Alto, California; and the University of Orléans,§ Orléans, France*

**Tumor necrosis factor (TNF) plays a critical role in the host response to the intracellular pathogen *Listeria monocytogenes* (LM). TNF exists in soluble and membrane-bound forms and exhibits both unique and overlapping activities. We examined the role of membrane TNF in the absence of secreted TNF for host resistance in knockin mice in which the endogenous TNF was replaced by a regulated, noncleavable allele (mem-TNF). Macrophages expressing mem-TNF produced nitric oxide and displayed normal bactericidal activity. Although mice completely deficient in TNF ($TNF^{-/-}$) succumbed to LM infection within 4 days, mem-TNF mice controlled LM infection at a low dose ($10^4$ CFU) but succumbed at a higher dose of infection ($10^5$ CFU). In contrast to complete TNF deficiency, mem-TNF mice developed confined microabscesses that expressed inducible nitric oxide synthase. The transfer of lymphocytes from immunized mem-TNF, but not $TNF^{-/-}$, mice protected $TNF^{-/-}$ mice from fatal infection. Taken together the data suggest that in the absence of soluble TNF, the presence of membrane-expressed TNF on phagocytes and lymphocytes partially restores host defense to LM infection. *(Am J Pathol 2005, 167:1677–1687)***

Protective immunity to *Listeria monocytogenes* (LM) infection, both in humans and experimental animals, is based on orchestrated action of T cells, macrophages, and cytokines, including interferon (IFN)-$\gamma$, interleukin (IL)-12, and tumor necrosis factor (TNF).[1] A critical role for TNF in anti-LM defense is inferred from neutralization and gene deletion experiments in mice.[2,3] In addition, the TNF-related cytokines lymphotoxin (LT)-$\alpha$ and LT-$\beta$ are also required to control LM infection.[4] Both secreted TNF and LT-$\alpha$ signal through p55 and p75 TNF receptors (TNFR1 and TNFR2, respectively). The cell-bound LT-$\alpha\beta$ heterotrimers recognize the LT-$\beta$R. TNF-R1 signaling appears to be critical for the control of LM infection[2,3] and LT-$\beta$R also plays a distinct role, while the contribution of TNFR2 is less well defined.

TNF is expressed by a variety of cells, including macrophages and T cells, and is a major regulator of inflammation and leukocyte trafficking.[5] TNF is first produced as an integral membrane protein and is subsequently cleaved by the metalloproteinase-disintegrin TACE (TNF-$\alpha$ converting enzyme)[6,7] into the secreted trimeric TNF. Although the role of TNF in controlling intracellular bacterial infections is uncontested, the function of membrane TNF in host resistance is less understood.

Several biological functions of membrane TNF have been described, such as cytotoxicity, polyclonal activation of B cells, induction of IL-10 by monocytes, induction of chemokines, and ICAM-1 expression on endothelial cells.[8–10] The transgenic overexpression of membrane TNF has demonstrated an *in vivo* role in the control of LM and mycobacterial infection.[11–13] However, these models were potentially nonphysiological as transgenic expression of a membrane-only form of TNF results in artificially high and nonselective expression of membrane TNF. The recent generation of mice with functional, normally regulated and expressed membrane-bound TNF, obtained by knocking-in an uncleavable $\Delta$1-9, K11E TNF allele (mem-TNF mice), represents a major advance and allows interesting insights in the role of membrane TNF in lymphoid structure development and inflammation.[14]

The question whether membrane TNF expression may be sufficient to control *Listeria* infection is becoming very relevant. Indeed, TNF-neutralizing therapies using anti-

Supported by the Fondation de la Recherche Medicale, Ligue Contre le Cancer, and by a bursary from the French Ministry of Education, France.

Accepted for publication August 15, 2005.

Present address of J.D.S.: Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN 46285.

Address reprint requests to Bernhard Ryffel, CNRS, IEM 2815, 3B rue de la Ferollerie, Orleans, France. E-mail: bryffel@cnrs-orleans.fr.

bodies or soluble receptors have been very successful in severe inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis, Crohn's disease, or psoriasis, with more than a million patients treated. However, opportunistic infections including *Listeria* or tuberculosis represent a major complication of these therapies.[15–18] Therefore, the identification of the respective roles of membrane-bound versus soluble TNF in host response to infection may elucidate second generation anti-TNF therapies targeted to spare the host defense to infections.

In the present investigation we asked whether membrane TNF is sufficient to contain LM infection. We used the mem-TNF knockin mice and compared the host resistance to LM infection in mem-TNF mice and TNF-deficient mice. Our data demonstrate that membrane TNF is biologically active and may act as a substitute for soluble TNF at low-dose infection because mem-TNF mice survive an LM infection that is fatal for complete $TNF^{-/-}$ mice. Furthermore, cell transfer experiments from immunized mem-TNF mice to TNF-deficient mice suggest that LM-antigen-specific T cells that express membrane-only TNF are sufficient to confer protection against LM infection.

## Materials and Methods

### Mice

Mem-TNF,[14] $TNF^{-/-}$,[19] and C57BL/6 control mice were bred in our specific pathogen-free animal facility at the Centre National de la Recherche Scientifique. Mem-TNF mice were generated on a C57BL/6 background while $TNF^{-/-}$ mice were backcrossed for 10 generations onto the C57BL/6 background. For all experiments adult (8 to 12 weeks old) animals were kept in sterile confinement in a P2 animal unit. The infected mice were monitored regularly for clinical status and weighed daily. Mice were bled before and at 1, 2, 3, and 4 days after infection to assess the hematological parameters in the blood using a Technikon H1E analyzer (Bayer, Paris, France). All animal experiments complied with the French Government's ethical and animal experiment regulations.

### Culture of Bacteria

LM wild-type L028 and ActA deficient strains were provided by Prof. P. Cossart (Pasteur Institute, Paris, France) and cultured in trypticase soy broth (soybean casein digest medium; Biovalley, Marve la Vallée, France). Bacteria were aliquoted and stored in 30% glycerol at −80°C at a concentration of $5 \times 10^9$ CFU/ml. Heat-killed LM (HKLM) was prepared by incubation at 60°C for 1 hour followed by two washes with sterile phosphate-buffered saline (PBS).

### Primary Macrophage and Dendritic Cell Culture

Murine bone marrow cells were isolated from femurs and differentiated into macrophages after culturing at $10^6$ cells/ml for 7 days in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma) supplemented with 20% horse serum and 30% L929 cell-conditioned medium as described before.[20,21] Seven days after washing and reculturing in fresh medium, the cell preparation consisted of a homogenous population of macrophages (>97% $CD11b^+$ cells). Alternatively, murine bone marrow cells were differentiated into myeloid dendritic cells (>98% $CD11c^+$ cells) after culturing at $2 \times 10^5$ cells/ml for 10 days in RPMI supplemented with 10% fetal calf serum, glutamine, antibiotics, and 4% J558L cell-conditioned medium as a source of GM-CSF, as described.[22]

Bone marrow-derived macrophages (BMDMs) and dendritic cells were plated in 96-well microculture plates (at $10^5$ cells/well) and stimulated with lipopolysaccharide (LPS) (*Escherichia coli*, serotype O111:B4 at 100 ng/ml; Sigma), HKLM (at a bacteria:cell ratio of 200:1), and live LM (at a bacteria:cell ratio of 2:1). After 24 hours of stimulation, the supernatants were harvested for cytokine determination.

### Macrophage Killing Assay

To test LM killing, macrophages from the different strains were incubated for 20 minutes at 37°C with LM at a multiplicity of infection (MOI) of 1 in Dulbecco's modified Eagle's medium complemented with L-glutamine (5 mmol/L) and 10% fetal calf serum. After addition of gentamicin (10 $\mu$g/ml), macrophages were extensively washed to remove extracellular bacilli, and incubated in the same medium with and without recombinant mouse TNF (rmTNF, 10 ng/ml; PreproTech, Rocky Hill, NJ). After 3 and 6 hours of incubation, the number of viable intracellular bacteria in each well was determined by culturing on tryptic soy broth agar plates. Plating was performed in duplicate serial dilutions and macrophage killing was assessed by the determination of CFU in infected macrophages from two individual mice per group.

### Cytokine Determination

IL-12p40 or IFN-$\gamma$ were quantified using commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits following the instructions of the manufacturer (Duoset; R&D Systems, Abingdon, UK). As described previously, bioactive TNF was assessed using the WEHI 164 cell-based bioassay, which has a higher sensitivity than ELISA, detecting 0.5 pg/ml of TNF.[23]

### Flow Cytometry

After stimulation, macrophages were harvested, washed once in PBS containing 0.5% bovine serum albumin (PBS/BSA), and incubated on ice at $10^5$ cells/50 $\mu$l with 2% mouse serum for 20 minutes. After centrifugation (10 minutes at $200 \times g$, 4°C), macrophages were incubated in PBS/BSA with primary antibodies (anti-CD40-PE clone 2G9, anti-CD86-PE clone GL1, or anti-CD11b-PerCP Cy5.5 clone M1/70) for 20 minutes in the dark. All antibodies were from BD Pharmingen (San Diego, Ca). After

washing with PBS/BSA, cells were analyzed on a Becton Dickinson LSR analyzer.

## Mouse Infection, Vaccination, and Transfer of Splenic T Cells

### Infection

Mice were injected intravenously in the caudal vein with $10^4$ or $10^5$ CFU of LM per mouse as described before.[21] On day 3, liver and spleen were harvested. The number of viable bacteria in organ homogenates was determined by plating serial dilutions on trypticase soy broth agar plates (Biovalley) and incubating for 24 hours at 37°C followed by counting CFU.

### Restimulation and Transfer of Splenic Cells

Splenocyte suspensions were obtained from C57BL/6, $TNF^{-/-}$, and mem-TNF mice 7 days after injection of $10^6$ ACTA-deficient LM or saline. Nonadherent cells were restimulated *in vitro* with LM, HKLM, listeriolysin (LLO) peptide (fragment 189-201; Neosystem, Strasbourg, France), or *Mycobacterium bovis*-bacillus Calmette-Guerin (BCG), and the supernatants were assessed for IFN-$\gamma$ levels by ELISA. For the cell transfer, $2 \times 10^7$ nonadherent cells (>95% lymphocytes with 65% $CD3^+$ T cells) in 200 $\mu$l were injected intravenously into $TNF^{-/-}$ recipient mice, followed 1 hour later by intravenous injection of LM at $10^4$ CFU/mice. Body weight was recorded daily, and the spleen and liver were taken 3 days after infection to enumerate viable bacteria.

## Histology and Immunohistochemistry

Samples of liver and spleen were fixed in 10% buffered formalin (Shandon, Pittsburgh, PA). Tissues were dehydrated in ethanol and embedded in paraffin. Sections (4 $\mu$m) were cut and stained with hematoxylin and eosin (H&E) for evaluation of pathological changes. The number of microabscesses was quantified by counting 20 microscopic fields at ×100 magnification. The size of microabscesses was assessed by measuring the diameter of 20 randomly selected micro-abscesses per mouse at ×400 magnification.

For immunohistochemical analysis, liver and spleen were embedded with Tissue-Tek (Sakura, Zoeterwoude, The Netherlands) in cryomolds, immediately frozen on dry ice, and stored at −80°C as described before.[24] The frozen tissues were cut at 5-$\mu$m thickness on a cryostat (Leica, Nussloch, Germany), air-dried, and stored at −80°C. Before use the sections were fixed in acetone (10 minutes at 4°C), and endogenous peroxidase activity was blocked using methanol with 1% $H_2O_2$ (30 minutes). Endogenous biotin in the liver was blocked using PBS containing 0.1% avidin (20 minutes) and PBS containing 0.01% biotin (20 minutes). The tissue sections were incubated with appropriate normal serum (30 minutes) before incubation for 2 hours at 37°C with the primary antibody. Antibodies to GR1, F4/80, and inducible nitric oxide synthase (iNOS) were from BD Pharmingen. The sections were then incubated for 30 minutes at 37°C with the appropriate biotinylated secondary antibody. Avidin-biotin peroxidase complexes were added to the sections for 30 minutes (ABC Vector kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA), washed, and developed with diaminobenzidine substrate (DAKO, Glostrup, Denmark). After rinsing in PBS, the sections were mounted in Eukitt (Kindler and Co., Freiburg, Germany).

## Nitrite Measurements

Nitrite concentrations in supernatants from macrophages were determined using the Griess reaction (1% sulfanilamide in 2.5% phosphoric acid and 0.1% *n*-1-napthylethylenediamide dichloride in 2.5% phosphoric acid).[25] After a 30-minute incubation at room temperature under agitation, the absorbance at 540 nm was measured ($NO_2^-$ was quantified using $NaNO_2$ as a standard).

## Statistical Analysis

Statistical evaluation of differences between the experimental groups was determined by Kaplan-Meier test for survival curves, Mann-Whitney *U*-test for *ex vivo* experiments, and Student's *t*-test for *in vitro* data, using Prism software.

# Results

## Absence of Secreted TNF, but Normal Nitric Oxide Production and Killing of LM by Mem-TNF Macrophages

We first investigated whether cultured BMDM secrete TNF in response to LPS, LM, or heat-killed LM (HKLM). Soluble TNF was secreted by BMDM from wild-type mice but was essentially undetectable in culture supernatants of BMDM from mem-TNF and $TNF^{-/-}$ mice using the sensitive WEHI bioassay (Figure 1A), in agreement with the original report.[14] To confirm that mem-TNF knockin mice do not secrete TNF *in vivo*, mice were injected intraperitoneally with 100 $\mu$g of LPS, blood was collected 90 minutes later, and serum was analyzed for TNF content. In contrast to wild-type mice, which displayed significant serum TNF levels, TNF was undetectable in the sera of both $TNF^{-/-}$ and mem-TNF mice (data not shown). We next determined whether IL-12p40 and nitric oxide production by LPS-, LM-, or HKLM-stimulated BMDMS was dependent on TNF expression. Macrophages secreted IL-12p40 on stimulation with LPS, LM, or HKLM, and we observed unexpectedly high IL-12p40 levels in $TNF^{-/-}$ as compared to wild-type macrophages (Figure 1B). An overproduction of Th1 cytokines has been demonstrated previously in TNF-deficient mice on *Mycobacterium bovis*-bacillus Calmette-Guerin (BCG) infection,[26,27] suggesting that TNF has a regulatory role for Th1 cytokine response. Such a deregulation of Th1 response has not been reported for LM infection, so we

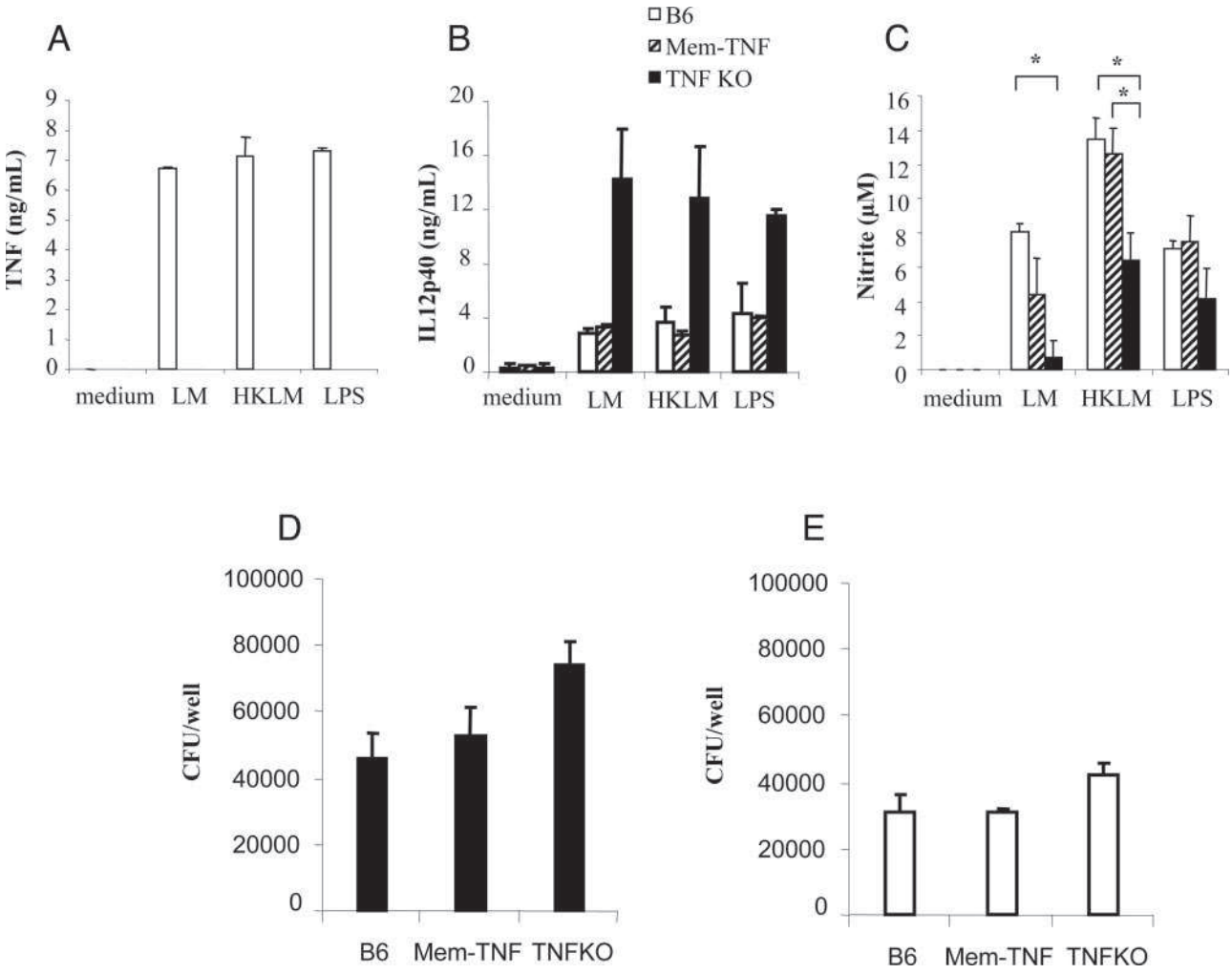



**Figure 1.** Impaired soluble TNF but normal IL-12p40, nitrite production, and killing of LM by macrophages from mem-TNF mice. **A–C:** TNF (**A**), IL-12p40 (**B**), and nitrite (**C**) production measured in the supernatant of macrophages from C57BL/6, mem-TNF, and $TNF^{-/-}$ mice 24 hours after infection by LM (MOI of 2) or stimulation by heat-killed LM (HKLM; 200 bacteria per cell) or LPS (100 ng/ml). Results are means ± SD of two mice per genotype and are representative of three independent experiments (*$P < 0.05$). **D** and **E:** Killing of viable LM by macrophages expressed as CFU per $10^5$ macrophages at 3 hours. **D:** Macrophages were infected with LM (MOI of 1) for 20 minutes, washed extensively to remove extracellular bacilli, and further incubated for 3 hours, after which CFU were determined. **E:** Addition of recombinant mouse TNF (10 ng/ml) corrected the killing of LM by $TNF^{-/-}$ macrophages. Results expressed as CFU per $2 \times 10^5$ macrophages at 3 hours after infection showed no significant differences. Data are given as the mean ± SD ($n = 2$ mice with duplicate CFU analysis per group) and are from one representative experiment of two independent experiments.

then asked whether mem-TNF macrophages retained an augmented IL-12p40 response comparable to $TNF^{-/-}$ macrophages. Interestingly, mem-TNF macrophages expressed IL-12p40 levels comparable to those of wild-type macrophages. The data therefore suggest that membrane TNF prevents the exaggerated IL-12p40 responses seen in the complete absence of TNF, but the mechanism of deregulated Th1 response is still unclear.[26,27]

Killing of bacilli critically depends on activation of NOS2.[28] We therefore tested the production of nitrite after LM macrophage activation. Nitrite production in mem-TNF BMDMs stimulated with LM, HKLM, or LPS was similar to the levels seen in wild-type cells but partially reduced in $TNF^{-/-}$ macrophages (Figure 1C). To assess the biological relevance of the measured nitrite levels, the bactericidal activity of mem-TNF macrophages was tested. Macrophages from mem-TNF mice had capacity to kill LM comparable to that of wild-type cells, and CFU levels were higher in TNF-deficient macrophages at 3 hours (Figure 1D) and 6 hours (data not shown), but this did not reach statistical significance. Addition of recombinant mouse TNF to the macrophages in culture increased the bactericidal effect in all groups, but importantly, it corrected the defect of TNF-deficient macrophages (Figure 1E). Therefore, the data suggest that membrane TNF expressed by macrophages is sufficient to induce early nitrite production by macrophages and killing of LM, both of which are impaired in the complete absence of TNF. Lastly, LM-induced up-regulation of costimulatory molecules in macrophages and dendritic cells was TNF-independent because CD40 and CD86 expression was comparable in wild-type, mem-TNF, and $TNF^{-/-}$ macrophages (data not shown).

Taken together, these observations confirm the absence of functional soluble TNF in mem-TNF mice[14] and imply that membrane-bound TNF can substitute soluble TNF in some of its functions: macrophages from mem-

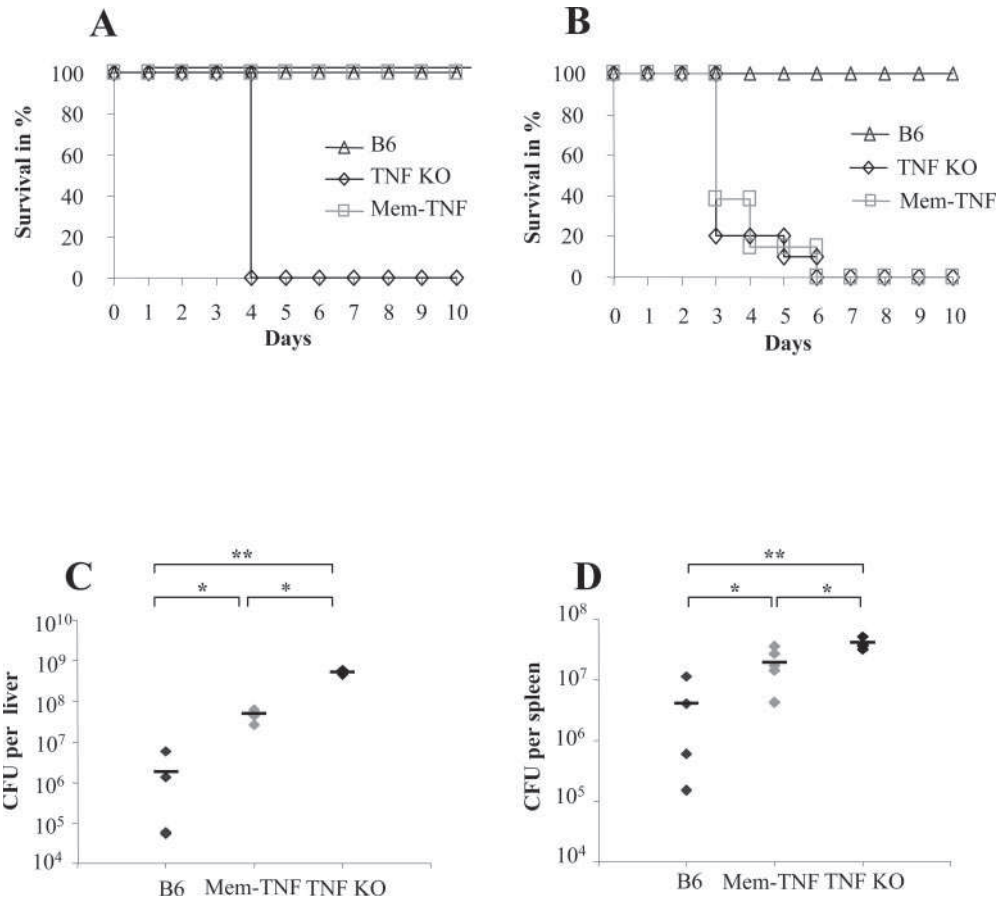



**Figure 2.** Enhanced control of LM infection in mem-TNF mice compared to TNF-deficient mice. **A** and **B:** Survival on intravenous infection with doses of LM at $10^4$ CFU (**A**, $n = 4$ mice; Kaplan-Meier B6 versus TNF KO, $P < 0.01$; mem-TNF versus TNF KO, $P < 0.01$) or at $10^5$ CFU (**B**, $n = 9$ to 13; B6 versus mem-TNF, $P < 0.01$; B6 versus TNF KO, $P < 0.01$). **C** and **D:** Bacterial load in the liver (**C**) and spleen (**D**) of mem-TNF, $TNF^{-/-}$ mice (KO), and wild-type (B6) mice 3 days after infection with $10^4$ CFU. Each group comprised four to six mice; mean values ± SD are given. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$. The results are from one experiment representative of two independent experiments.

TNF mice were able to produce nitrite and control infection *in vitro*. Therefore, it was reasonable to assume that membrane TNF may confer resistance to LM infection *in vivo*.

## *Mem-TNF Mice Are More Resistant to LM Infection Than $TNF^{-/-}$ Mice*

A critical role for TNF has been shown in the control of LM infection.[2,3] We confirmed the role of TNF and further ascribed it to both soluble and membrane TNF (Figure 2, A and B). Soluble TNF was dispensable at low infection dose of LM ($10^4$ CFU) because mem-TNF mice survived a dose at which $TNF^{-/-}$ mice succumbed ($P < 0.05$, Figure 2A). However, at the higher infectious dose of $10^5$ CFU, both $TNF^{-/-}$ and mem-TNF mice, but not wild-type mice, succumbed to infection ($P < 0.05$, Figure 2B). The increased resistance of mem-TNF mice correlated with reduced bacterial burden in the liver of these mice as compared to $TNF^{-/-}$ mice after infection with $10^4$ CFU of LM ($P < 0.05$, Figure 2C). In mem-TNF mice the CFU values were slightly higher than in wild-type mice in liver and spleen ($P < 0.05$; Figure 2, C and D). Thus, the bacterial burden in mem-TNF was intermediate from the values found in wild-type and $TNF^{-/-}$ mice. The results indicate that in the absence of soluble TNF, membrane-bound TNF confers substantial protection to LM infection, sufficient to control a low-dose but not a high-dose infection.

## *Smaller and Confined Hepatic Microabscesses in Mem-TNF Mice*

To gain more insight in the cellular mechanisms of mem-TNF sustained resistance we next investigated the morphology of liver tissue 3 days after infection. The typical hepatic microabscesses rich in neutrophils induced by LM infection were more abundant in mem-TNF mice as compared to wild-type controls while the microabscesses appeared larger with diffuse infiltration and necrotic areas in the liver parenchyma in $TNF^{-/-}$ mice (Figure 3, A–F). The number of microabscesses was increased in mem-TNF and $TNF^{-/-}$ livers as compared to the wild-type controls (Figure 3G). In contrast, the size of the micro-abscesses increased in $TNF^{-/-}$ mice but appeared essentially normal in mem-TNF mice (Figure 3H).

Concomitant with the increased size, semiquantitative immunohistochemistry analysis of liver sections revealed

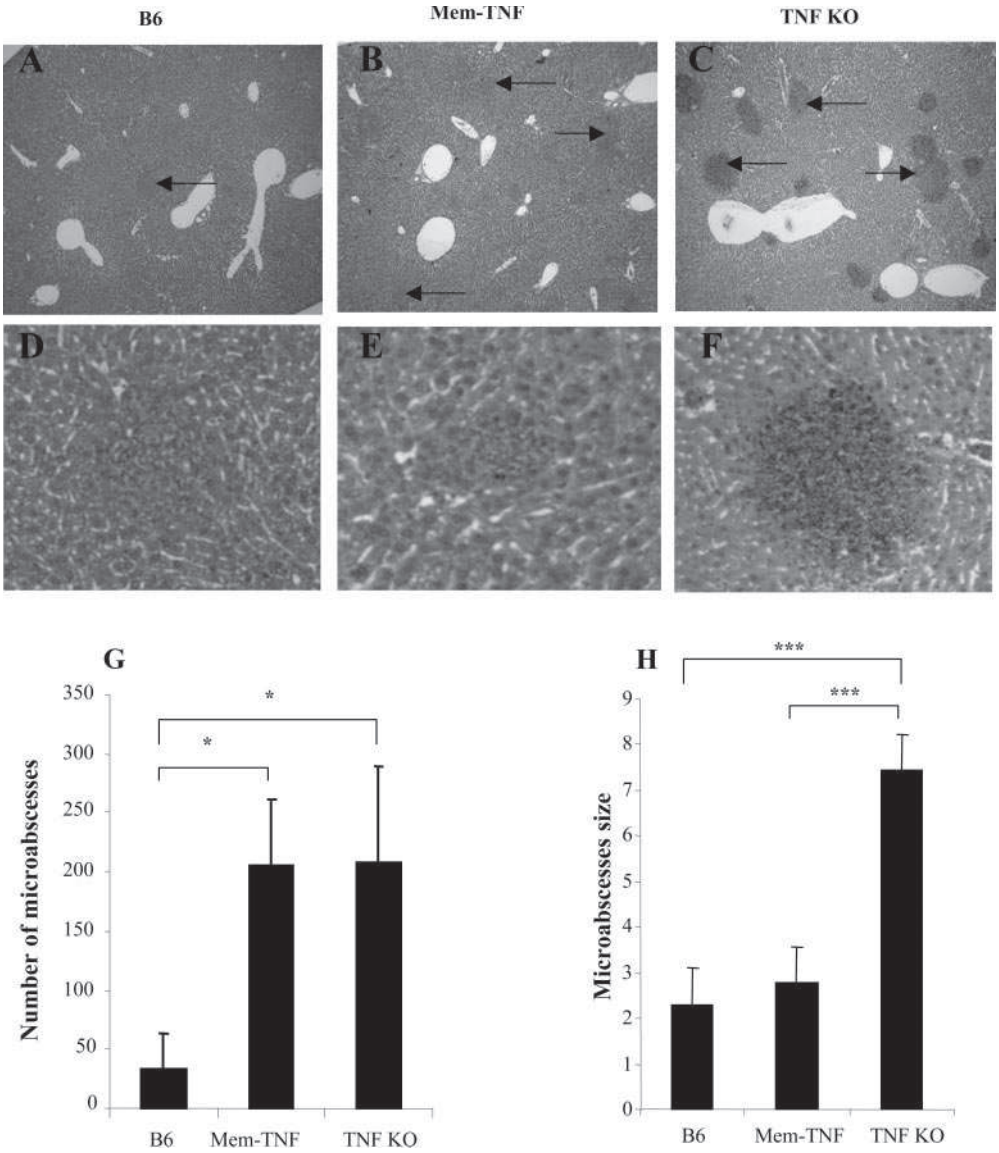



**Figure 3.** Numerous but confined, smaller hepatic microabscesses in mem-TNF mice compared to TNF-deficient mice. **A–F:** Histological sections of livers showing small confined microabscesses in mem-TNF and wild-type mice and spreading infection in TNF-deficient mice (TNF KO) (H&E staining). **G:** Increased number of microabscesses in mem-TNF and TNF-deficient mice as compared to wild-type controls. $^{*}P < 0.05$. **H:** Normal-sized microabscesses in mem-TNF mice as compared to TNF-deficient mice. Mean diameters ± SD (arbitrary units) of abscesses are given. $^{***}P < 0.001$. Wild-type, mem-TNF, and TNF-deficient mice were infected with $10^5$ CFU of LM and examined for histology 2 days after infection ($n = 4$ mice per group). Original magnifications: ×40 (**A–C**); ×100 (**D–F**).

increased neutrophil ($GR1^+$) and macrophage ($F4/80^+$) levels in $TNF^{-/-}$ (Figure 4, G and H) but not in mem-TNF-infected mice (Figure 4, D and E) compared to wild-type mice (Figure 4, A and B). The hepatic expression of iNOS, as assessed by immunostaining,[24] was similar in microabscesses of mem-TNF mice (Figure 4F) as compared to wild-type controls (Figure 4C) but distinctly more pronounced than in $TNF^{-/-}$ mice (Figure 4I). Therefore, the morphological assessment revealed increased leukocyte recruitment in $TNF^{-/-}$ mice. Membrane TNF expression allowed a controlled recruitment of neutrophils. The activation of inflammatory cells seemed more effective in the liver of membrane TNF-expressing mice as compared to complete TNF deficiency, as illustrated by the iNOS expression levels.

To follow more closely the systemic effects of LM infection, blood differential leukocyte counts were determined. An augmented base-line leukocyte count in $TNF^{-/-}$ and LT-$\alpha^{-/-}$ mice has been reported before and may be due to a homing defect,[29,30] which is not seen in mem-TNF mice (data not shown). To normalize the data we expressed the changes in blood cell counts as percentage of the cell counts before infection. LM infection induced an initial increase (day 1) followed by a decrease of neutrophil counts on day 2 after infection (Figure 5A). This neutropenia was transient in wild-type and mem-TNF mice and recovered thereafter (data not shown). Neutropenia was pronounced and sustained in $TNF^{-/-}$ mice. Lymphocyte counts were reduced in all groups at 2 days, in line with published data on massive

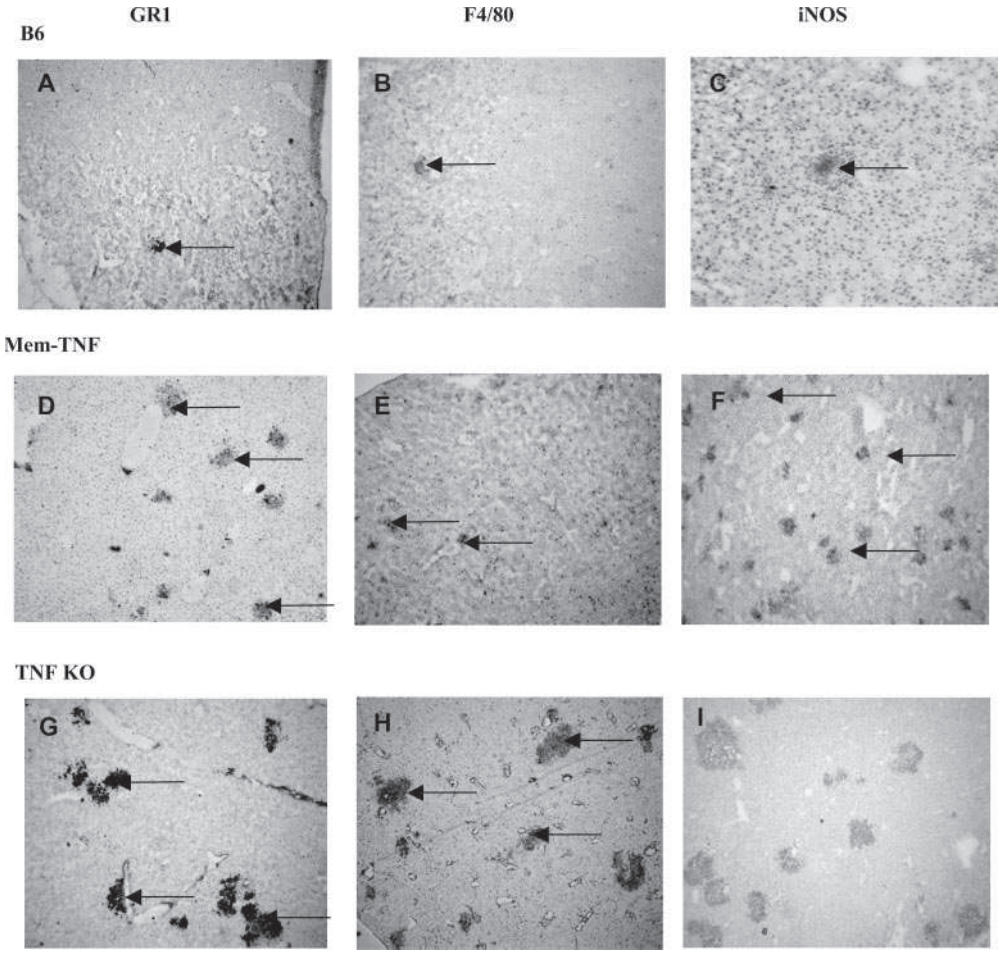



**Figure 4.** Increased neutrophil recruitment and iNOS expression in hepatic microabscesses from mem-TNF mice. Wild-type, mem-TNF, and TNF-deficient mice were infected with $10^4$ CFU of LM, and frozen liver sections were immunostained with GR1, F4/80, or NOS2 antibodies, as described in Materials and Methods. **Black arrows** point to positive staining in microabscesses. Representative micrographs are shown ($n = 4$ mice per group). Original magnifications, ×40.

apoptosis of lymphocytes in the spleen. Lymphocyte numbers partially recovered thereafter in mem-TNF and wild-type mice but remained very low in $TNF^{-/-}$ mice (Figure 5B). Activated lymphocytes, as defined by their morphology, were found in controls and mem-TNF mice but absent in $TNF^{-/-}$ mice (Figure 5C). Therefore, membrane TNF provides protective signals that allow a controlled systemic and hepatic inflammation with a rapid recovery of blood counts after infection.

## *T-Cell Response to LM and Protection of TNF-Deficient Mice by Transfer of Immune T Cells from Mem-TNF Mice*

Because the expression of co-stimulatory molecules was normal in the complete absence of TNF, we asked whether TNF-deficient mice infected with the attenuated, ActA-deficient LM strain were able to mount protective immunity. First, the T-cell response induced by ActA-deficient LM infection was tested, on *ex vivo* restimulation of splenic T lymphocytes with HKLM and LLO peptide 189-201. T cells from mem-TNF and $TNF^{-/-}$ mice injected with $10^6$ ActA-deficient LM attenuated strain 7 days before responded with a comparable IFN-$\gamma$ production as wild-type mice to restimulation by HKLM or LLO 189-201 (Figure 6A). This response was specific to LM because no restimulation was obtained with the unrelated mycobacterium BCG. Therefore, TNF appears not to be required for an antigen-specific immune response, consistent with previous reports.[31,32]

We next asked whether membrane TNF expressed on antigen-specific lymphocytes was sufficient to confer effective protection *in vivo*. To this end, $TNF^{-/-}$ mice received splenic lymphocytes ($2 \times 10^7$ cells, 95% lymphocytes) from wild-type, mem-TNF mice, or $TNF^{-/-}$ mice, either naïve or preinfected for 7 days with ActA-deficient LM strain ($10^6$ CFU). The recipient mice were then challenged with $10^4$ CFU of virulent LM. Lymphocytes from ActA-deficient LM-immunized wild-type and mem-TNF mice, but not $TNF^{-/-}$ mice (Figure 6A), prevented body weight loss (data not shown), and the reconstituted $TNF^{-/-}$ mice survived the virulent LM infection ($P < 0.05$, Figure 6B). The bacterial load in liver and spleen was tested on transfer of immune lymphocytes in $TNF^{-/-}$ mice. Three days after infection, CFU levels in liver and spleen were significantly lower in $TNF^{-/-}$ mice receiving

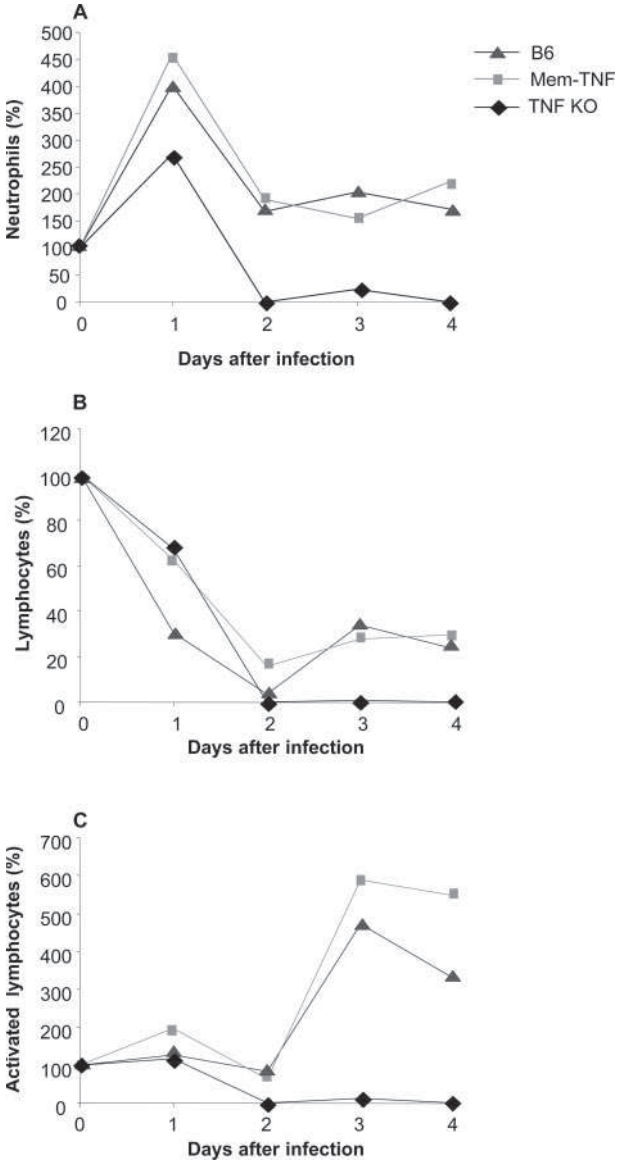



**Figure 5.** Sustained reduction of circulating neutrophils and lymphocytes in TNF-deficient, but not mem-TNF, mice after LM infection. Changes of neutrophil (**A**), lymphocyte (**B**), and activated lymphocyte (**C**) blood counts after LM infection are shown as percentage of the preinfection cell counts. Mice were infected with $10^4$ CFU of LM, and hematological parameters were determined at days 0 and 1 to 4 ($n = 4$) using a Technikon H1E analyzer.

an adoptive transfer of lymphocytes from immunized C57BL/6 or mem-TNF mice (Figure 6, C and D) but not from immune $TNF^{-/-}$ mice. Finally, $TNF^{-/-}$ mice transferred with immune lymphocytes from wild-type or mem-TNF mice, but not $TNF^{-/-}$ mice, had very small hepatic granulomas compared to $TNF^{-/-}$ control mice (Figure 7), indicating that the inflammation and infection were controlled by the adoptive transfer of mem-TNF-expressing lymphocytes.

The data demonstrate that membrane TNF is able to control a low-dose LM infection and that adoptive transfer of immune lymphocytes expressing membrane TNF confers protection in $TNF^{-/-}$ mice. Despite a normal T-cell response on vaccination, $TNF^{-/-}$ mice were not resistant to LM infection after transfer of immune $TNF^{-/-}$ lymphocytes. Therefore, the transfer experiments indicate that membrane-expressed TNF is essential to mount protective immunity in TNF-deficient mice.

## *Discussion*

We report here that membrane TNF plays an important role in the control of LM infection using a knockin mouse model in which the endogenous TNF allele was replaced by a noncleavable membrane TNF.[14] The sole expression of membrane TNF endows macrophages to kill LM *in vitro* and confers substantial protection to infection with LM *in vivo*. Further, the transfer of immune lymphocytes from membrane TNF mice confers resistance to LM infection in the absence of secreted TNF.

A critical role of TNF for the effective control and resolution of LM infection has been demonstrated previously.[2,3] Furthermore, TNF derived from hematopoietic cells, especially macrophages/neutrophils, plays a critical role in inflammatory reactions[20,33] and *Listeria* infection.[34] For mycobacterial infection a partial protective effect has been shown by membrane TNF in the same noncleavable membrane TNF mouse[35] and in a different transgenic mouse model.[13] The partial protection generated in mem-TNF mice could indicate local cell-to-cell TNF signaling by membrane-expressed TNF on T cells or macrophages at the site of infection, leading to a partial activation of the immune cells. Indeed, for the resistance to intracellular pathogens TNF must be produced locally,[36] whereas exogenous systemically administered TNF is ineffective.[37] Several biological functions of membrane TNF signaling through both TNFR1 and TNFR2 have been reported previously *in vitro*[9] and *in vivo* using transgenic mice expressing membrane TNF.[38,39] Because $TNFR2^{-/-}$ mice are resistant (data not shown) and $TNF\text{-}R1^{-/-}$ mice are highly sensitive to LM infection,[2,3] the data suggest that membrane TNF signals through TNF-R1 to confer protection to LM infection. Further, membrane TNF has been shown to be involved in reverse (outside-to-inside) signaling. On ligation of the receptor, mem-TNF-expressing cells are activated to express E-selectin.[40] Thus, membrane TNF in T cells might function as a bipolar positive regulator of inflammation, either transmitting signals as a ligand to target cells or receiving signals through membrane TNF itself into T cells.

Although the exact mechanism of how protection is acquired through membrane TNF is unclear, membrane TNF on activated T cells might be sufficient for activation of macrophages at low-dose infection, resulting in the up-regulation of NOS2 expression, which is crucial for bacterial killing.[28] However, during high-dose infection, secreted TNF and distal signaling, especially for leukocyte recruitment, appears to be required for a full protective host response.

In response to mycobacterial infection, $TNF^{-/-}$ mice develop an uncontrolled type 1 immune response with increased IL-12 and IFN-$\gamma$ production and tissue destruction.[26] The IL-12 overproduction and the spreading of the microabscesses seen in LM-infected $TNF^{-/-}$ mice was abrogated in mem-TNF mice, indicating that the mem-

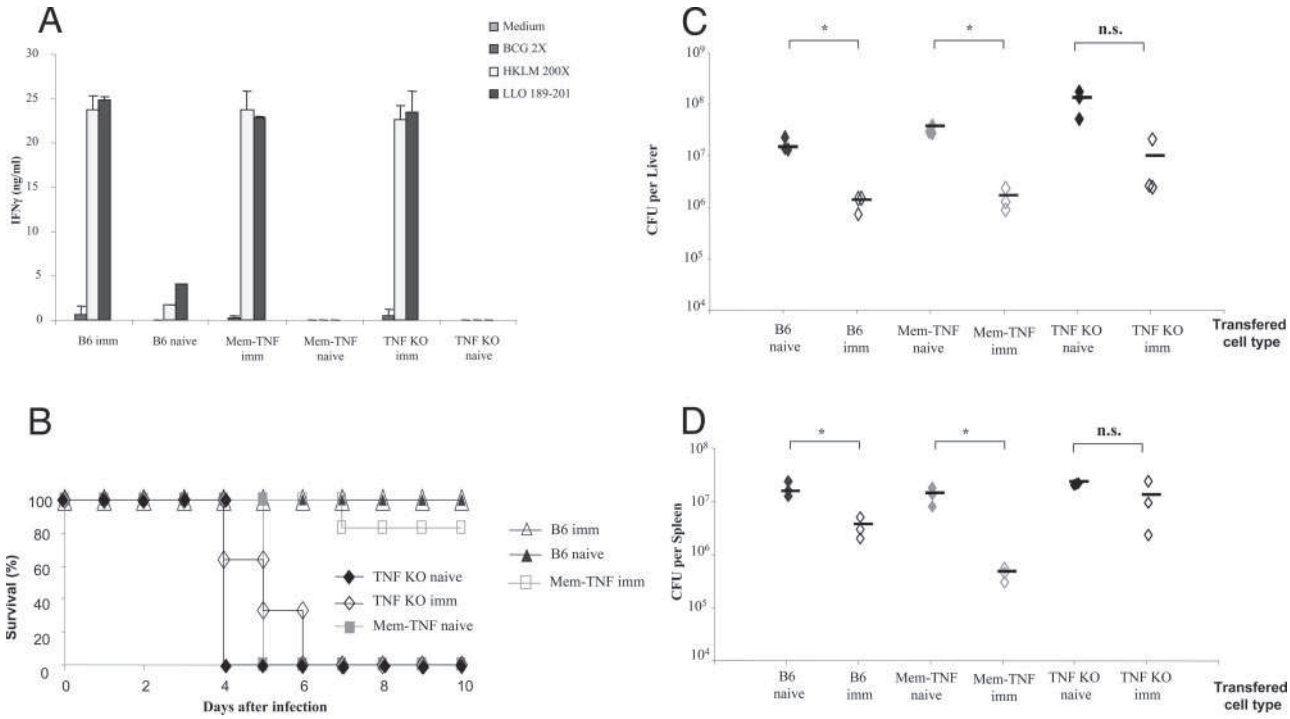



**Figure 6.** Enhanced resistance of TNF-deficient mice to virulent LM infection after lymphocyte transfer from immune mem-TNF mice. **A:** Production of IFN-γ on antigen restimulation of T cells from LM-infected mice, independent of TNF. Splenic T cells from wild-type, mem-TNF, and $TNF^{-/-}$ mice, either naïve or infected with $10^6$ CFU of ActA-deficient LM strain 7 days before (imm), were restimulated *ex vivo* with HKLM (200 bacteria per cell) and LLO 189-201 (1 μg/ml) or an irrelevant antigen (BCG at an MOI of 2): IFN-γ levels were measured in the supernatant at 24 hours by ELISA. Data are expressed as the mean ± SD ($n = 3$ mice). **B:** Enhanced survival of TNF-deficient mice receiving lymphocytes from immune mem-TNF mice. Splenic nonadherent cells ($2 \times 10^7$) from naïve or ActA-deficient LM-vaccinated C57BL/6, mem-TNF, and TNF-deficient mice (as above) were transferred into $TNF^{-/-}$ mice 1 hour before intravenous infection with $10^4$ CFU of LM. Survival was recorded daily ($n = 3$ naïve and $n = 6$ immune mice; Kaplan-Meier mem-TNF naïve versus mem-TNF imm, $P < 0.05$). **C** and **D:** Control of bacterial growth in TNF-deficient mice by adoptive transfer from immune mem-TNF, but not TNF-deficient, mice. Bacterial load in liver (**C**) and spleen (**D**) of TNF-deficient mice reconstituted with immunized splenic cells as in (**B**), 3 days after infection with $10^4$ CFU of LM. Bacterial load expressed as CFU per organ, individual counts from one representative of two experiments are shown (*$P < 0.05$).

brane form of TNF is sufficient to control LM infection. However, to what extent an exaggerated type 1 response may contribute to uncontrolled LM infection in the complete absence of TNF is presently unknown.

Interestingly, mem-TNF and $TNF^{-/-}$ mice develop an LM-specific T-lymphocyte response as shown on restimulation of splenocytes with HKLM and LL0 189-201, producing comparable IFN-γ production to that of wild-type mice. Protective immunity to virulent LM after infection with attenuated strains has been described for $TNF\text{-}R1^{-/-}$ mice[31] and MyD88-deficient mice.[41] Similarly, MyD88-deficient mice are able to mount protective response to mycobacterial infection on vaccination.[42] Using TNF-deficient mice, we show that the TNF/TNFR1 pathways may not be absolutely necessary to develop adaptive immunity to LM on infection with an attenuated strain. This is in line with previous reports showing a critical role of cell-mediated immunity of CD8 T cells in controlling infection.[31,32] To assess whether membrane-expressed TNF on lymphocytes could confer protection, lymphocytes from immunized mice were transferred into $TNF^{-/-}$ mice. Splenocytes from mem-TNF mice, but not $TNF^{-/-}$ mice, conferred protection. The mice survived and were able to clear the bacteria from the organs. Interestingly, TNF-deficient splenocytes, although primed to LM antigens after vaccination and competent for producing IFN-γ on *ex vivo* restimulation, were unable to confer protection to TNF-deficient mice. It is likely that aside from the T-cell effector functions, membrane-expressed TNF on T cells activates macrophages and augments their bactericidal properties. CD8 T cells contribute to cell-mediated immunity to LM, as shown previously by antibody depletion of T-cell subpopulations.[41] Therefore our data suggest that membrane-expressed TNF on T cells is sufficient to reconstitute TNF deficiency and confer host protection.

In summary, we show here for the first time that membrane TNF participates in cell-mediated immunity to LM. In the absence of secreted TNF, membrane-bound TNF endows macrophages with enhanced capacity to kill LM. Protective immunity can be adoptively transferred by immune lymphocytes from vaccinated mem-TNF mice to naïve $TNF^{-/-}$ mice, suggesting that membrane-expressed TNF on lymphocytes is likely responsible for protective immune responses. The findings are significant, especially in the context of TNF-neutralizing therapies using antibodies or soluble receptors. Such strategies have been recently introduced and are now widely used in severe inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis, Crohn's disease, or psoriasis, in which the major complications are represented by opportunistic infections including *Listeria* and tuberculosis.[15–18] Delineating the respective role of membrane-bound versus soluble TNF in host response to infection might open new

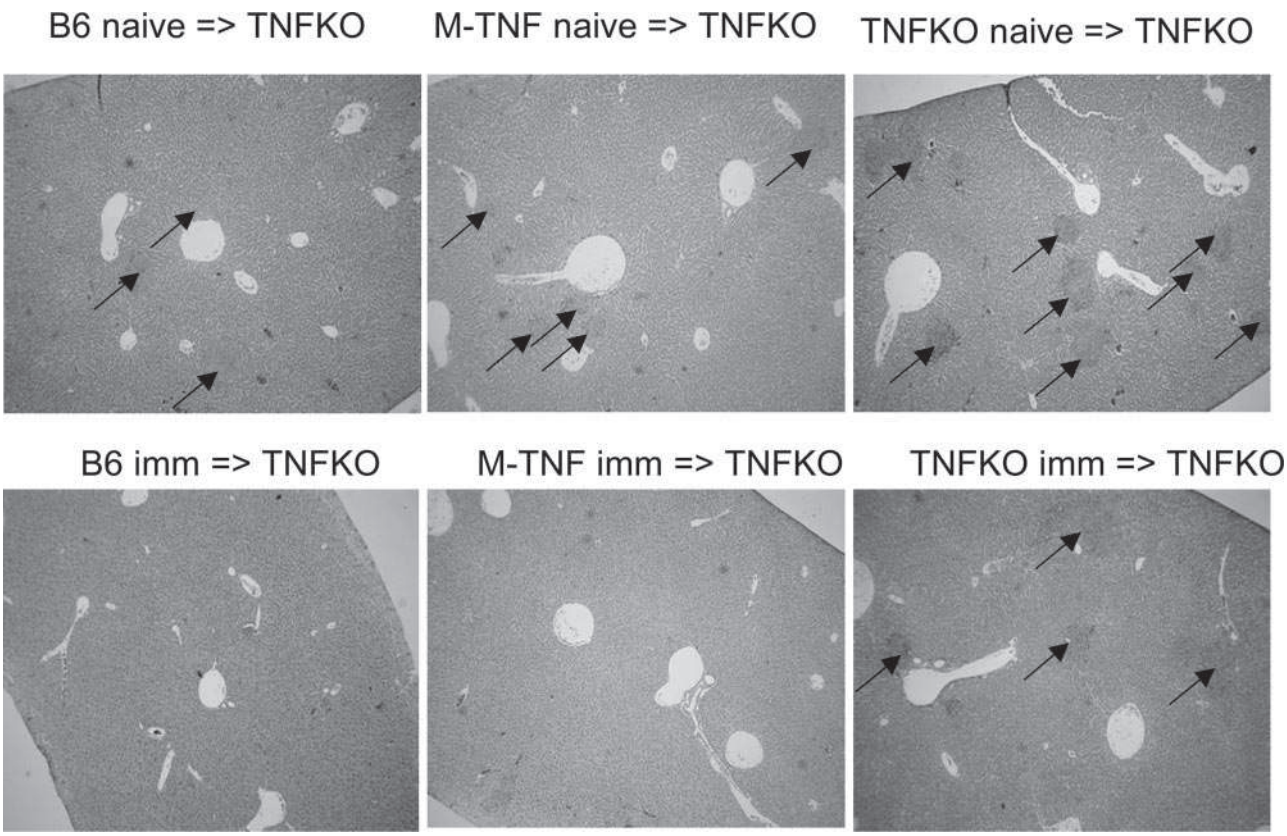



**Figure 7.** Controlled microabscesses in $TNF^{-/-}$ mice after adoptive transfer of lymphocytes from immune mem-TNF mice, but not $TNF^{-/-}$ mice. Splenic nonadherent cells ($2 \times 10^7$) from naïve or vaccinated C57BL/6, mem-TNF, and TNF-deficient mice were injected intravenously into $TNF^{-/-}$ mice as in Figure 6. Representative sections of liver microabscesses were examined 3 days after infection with $10^4$ CFU of LM ($n = 4$ mice per group, H&E staining). **Black arrows** point to microabscesses. Original magnifications, ×40.

avenues for better targeted, second generation anti-TNF therapies that spare the anti-microbial host defense.

## *Acknowledgments*

We thank Dr. R. Guler, Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine, University of Cape Town, Rondebosch, South Africa, for critical comments.

## *References*

1. Pamer EG: Immune responses to Listeria monocytogenes. Nat Rev Immunol 2004, 4:812–823
2. Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig TM, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, Wiegmann K, Ohashi PS, Kronke M, Mak TW: Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection. Cell 1993, 73:457–467
3. Rothe J, Lesslauer W, Lotscher H, Lang Y, Koebel P, Kontgen F, Althage A, Zinkernagel R, Steinmetz M, Bluethmann H: Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by Listeria monocytogenes. Nature 1993, 364:798–802
4. Ehlers S, Holscher C, Scheu S, Tertilt C, Hehlgans T, Suwinski J, Endres R, Pfeffer K: The lymphotoxin beta receptor is critically involved in controlling infections with the intracellular pathogens Mycobacterium tuberculosis and Listeria monocytogenes. J Immunol 2003, 170:5210–5218
5. Vassalli P: The pathophysiology of tumor necrosis factors. Annu Rev Immunol 1992, 10:411–452
6. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP: A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. Nature 1997, 385:729–733
7. Cerretti DP: Characterization of the tumour necrosis factor alpha-converting enzyme, TACE/ADAM17. Biochem Soc Trans 1999, 27:219–223
8. Decker T, Lohmann-Matthes ML, Gifford GE: Cell-associated tumor necrosis factor (TNF) as a killing mechanism of activated cytotoxic macrophages. J Immunol 1987, 138:957–962
9. Grell M, Douni E, Wajant H, Lohden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, Scheurich P: The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. Cell 1995, 83:793–802
10. Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD: A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. Cell 1988, 53:45–53
11. Pasparakis M, Alexopoulou L, Episkopou V, Kollias G: Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. J Exp Med 1996, 184:1397–1411
12. Olleros ML, Guler R, Corazza N, Vesin D, Eugster HP, Marchal G, Chavarot P, Mueller C, Garcia I: Transmembrane TNF induces an efficient cell-mediated immunity and resistance to Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin infection in the absence of secreted TNF and lymphotoxin-alpha. J Immunol 2002, 168:3394–3401
13. Olleros ML, Guler R, Vesin D, Parapanov R, Marchal G, Martinez-Soria E, Corazza N, Pache JC, Mueller C, Garcia I: Contribution of transmembrane tumor necrosis factor to host defense against Myco-

bacterium bovis bacillus Calmette-Guerin and Mycobacterium tuberculosis infections. Am J Pathol 2005, 166:1109–1120
14. Ruuls SR, Hoek RM, Ngo VN, McNeil T, Lucian LA, Janatpour MJ, Korner H, Scheerens H, Hessel EM, Cyster JG, McEvoy LM, Sedgwick JD: Membrane-bound TNF supports secondary lymphoid organ structure but is subservient to secreted TNF in driving autoimmune inflammation. Immunity 2001, 15:533–543
15. Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwieterman WD, Siegel JN, Braun MM: Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. N Engl J Med 2001, 345:1098–1104
16. Keane J: TNF-blocking agents and tuberculosis: new drugs illuminate an old topic. Rheumatology (Oxford) 2005, 44:714–720
17. Mohan AK, Cote TR, Siegel JN, Braun MM: Infectious complications of biologic treatments of rheumatoid arthritis. Curr Opin Rheumatol 2003, 15:179–184
18. Mohan AK, Cote TR, Block JA, Manadan AM, Siegel JN, Braun MM: Tuberculosis following the use of etanercept, a tumor necrosis factor inhibitor. Clin Infect Dis 2004, 39:295–299
19. Marino MW, Dunn A, Grail D, Inglese M, Noguchi Y, Richards E, Jungbluth A, Wada H, Moore M, Williamson B, Basu S, Old LJ: Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. Proc Natl Acad Sci USA 1997, 94:8093–8098
20. Muller M, Eugster HP, Le Hir M, Shakhov A, Di Padova F, Maurer C, Quesniaux VF, Ryffel B: Correction or transfer of immunodeficiency due to TNF-LT alpha deletion by bone marrow transplantation. Mol Med 1996, 2:247–255
21. Torres D, Barrier M, Bihl F, Quesniaux VJ, Maillet I, Akira S, Ryffel B, Erard F: Toll-like receptor 2 is required for optimal control of Listeria monocytogenes infection. Infect Immun 2004, 72:2131–2139
22. Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rossner S, Koch F, Romani N, Schuler G: An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. J Immunol Methods 1999, 223:77–92
23. Espevik T, Nissen-Meyer J: A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. J Immunol Methods 1986, 95:99–105
24. Garcia I, Guler R, Vesin D, Olleros ML, Vassalli P, Chvatchko Y, Jacobs M, Ryffel B: Lethal Mycobacterium bovis bacillus Calmette Guerin infection in nitric oxide synthase 2-deficient mice: cell-mediated immunity requires nitric oxide synthase 2. Lab Invest 2000, 80:1385–1397
25. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR: Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. Anal Biochem 1982, 126:131–138
26. Zganiacz A, Santosuosso M, Wang J, Yang T, Chen L, Anzulovic M, Alexander S, Gicquel B, Wan Y, Bramson J, Inman M, Xing Z: TNF-alpha is a critical negative regulator of type 1 immune activation during intracellular bacterial infection. J Clin Invest 2004, 113:401–413
27. Hodge-Dufour J, Marino MW, Horton MR, Jungbluth A, Burdick MD, Strieter RM, Noble PW, Hunter CA, Pure E: Inhibition of interferon gamma induced interleukin 12 production: a potential mechanism for the anti-inflammatory activities of tumor necrosis factor. Proc Natl Acad Sci USA 1998, 95:13806–13811
28. MacMicking JD, Nathan C, Hom G, Chartrain N, Fletcher DS, Trumbauer M, Stevens K, Xie QW, Sokol K, Hutchinson N, Chen H, Mudget JS: Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. Cell 1995, 81:641–650
29. De Togni P, Goellner J, Ruddle NH, Streeter PR, Fick A, Mariathasan S, Smith SC, Carlson R, Shornick LP, Strauss-Schoenberger J, Russell JH, Karr R, Chaplin DD: Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. Science 1994, 264:703–707
30. Eugster HP, Muller M, Karrer U, Car BD, Schnyder B, Eng VM, Woerly G, Le Hir M, di Padova F, Aguet M, Zinkernagel R, Bluethmann H, Ryffel B: Multiple immune abnormalities in tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha double-deficient mice. Int Immunol 1996, 8:23–36
31. White DW, Badovinac VP, Fan X, Harty JT: Adaptive immunity against Listeria monocytogenes in the absence of type I tumor necrosis factor receptor p55. Infect Immun 2000, 68:4470–4476
32. White DW, Badovinac VP, Kollias G, Harty JT: Cutting edge: antilisterial activity of CD8+ T cells derived from TNF-deficient and TNF/perforin double-deficient mice. J Immunol 2000, 165:5–9
33. Murphy CA, Hoek RM, Wiekowski MT, Lira SA, Sedgwick JD: Interactions between hemopoietically derived TNF and central nervous system-resident glial chemokines underlie initiation of autoimmune inflammation in the brain. J Immunol 2002, 169:7054–7062
34. Grivennikov SI, Tumanov AV, Liepinsh DJ, Kruglov AA, Marakusha BI, Shakhov AN, Murakami T, Drutskaya LN, Forster I, Clausen BE, Tessarollo L, Ryffel B, Kuprash DV, Nedospasov SA: Distinct and nonredundant in vivo functions of TNF produced by t cells and macrophages/neutrophils: protective and deleterious effects. Immunity 2005, 22:93–104
35. Saunders BM, Tran S, Ruuls S, Sedgwick JD, Briscoe H, Britton WJ: Transmembrane TNF is sufficient to initiate cell migration and granuloma formation and provide acute, but not long-term, control of Mycobacterium tuberculosis infection. J Immunol 2005, 174:4852–4859
36. Bekker LG, Moreira AL, Bergtold A, Freeman S, Ryffel B, Kaplan G: Immunopathologic effects of tumor necrosis factor alpha in murine mycobacterial infection are dose dependent. Infect Immun 2000, 68:6954–6961
37. Kindler V, Sappino AP, Grau GE, Piguet PF, Vassalli P: The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. Cell 1989, 56:731–740
38. Kusters S, Tiegs G, Alexopoulou L, Pasparakis M, Douni E, Kunstle G, Bluethmann H, Wendel A, Pfizenmaier K, Kollias G, Grell M: In vivo evidence for a functional role of both tumor necrosis factor (TNF) receptors and transmembrane TNF in experimental hepatitis. Eur J Immunol 1997, 27:2870–2875
39. Lucas R, Juillard P, Decoster E, Redard M, Burger D, Donati Y, Giroud C, Monso-Hinard C, De Kesel T, Buurman WA, Moore MW, Dayer JM, Fiers W, Bluethmann H, Grau GE: Crucial role of tumor necrosis factor (TNF) receptor 2 and membrane-bound TNF in experimental cerebral malaria. Eur J Immunol 1997, 27:1719–1725
40. Harashima S, Horiuchi T, Hatta N, Morita C, Higuchi M, Sawabe T, Tsukamoto H, Tahira T, Hayashi K, Fujita S, Niho Y: Outside-to-inside signal through the membrane TNF-alpha induces E-selectin (CD62E) expression on activated human CD4+ T cells. J Immunol 2001, 166:130–136
41. Way SS, Kollmann TR, Hajjar AM, Wilson CB: Cutting edge: protective cell-mediated immunity to Listeria monocytogenes in the absence of myeloid differentiation factor 88. J Immunol 2003, 171:533–537
42. Fremond CM, Yeremeev V, Nicolle DM, Jacobs M, Quesniaux VF, Ryffel B: Fatal Mycobacterium tuberculosis infection despite adaptive immune response in the absence of MyD88. J Clin Invest 2004, 114:1790–1799

# Dominant-Negative Inhibitors of Soluble TNF Attenuate Experimental Arthritis without Suppressing Innate Immunity to Infection

**Jonathan Zalevsky,* Thomas Secher,† Sergei A. Ezhevsky,* Laure Janot,† Paul M. Steed,* Christopher O'Brien,* Araz Eivazi,* James Kung,* Duc-Hanh T. Nguyen,* Stephen K. Doberstein,* François Erard,† Bernhard Ryffel,† and David E. Szymkowski[1]***

**TNF is a pleiotropic cytokine required for normal development and function of the immune system; however, TNF overexpression also induces inflammation and is associated with autoimmune diseases. TNF exists as both a soluble and a transmembrane protein. Genetic studies in mice have suggested that inflammation in disease models involves soluble TNF (solTNF) and that maintenance of innate immune function involves transmembrane TNF (tmTNF). These findings imply that selective pharmacologic inhibition of solTNF may be anti-inflammatory and yet preserve innate immunity to infection. To address this hypothesis, we now describe dominant-negative inhibitors of TNF (DN-TNFs) as a new class of biologics that selectively inhibits solTNF. DN-TNFs blocked solTNF activity in human and mouse cells, a human blood cytokine release assay, and two mouse arthritis models. In contrast, DN-TNFs neither inhibited the activity of human or mouse tmTNF nor suppressed innate immunity to *Listeria* infection in mice. These results establish DN-TNFs as the first selective inhibitors of solTNF, demonstrate that inflammation in mouse arthritis models is primarily driven by solTNF, and suggest that the maintenance of tmTNF activity may improve the therapeutic index of future anti-inflammatory agents.** ***The Journal of Immunology,*** **2007, 179: 1872–1883.**

Tumor necrosis factor is a multifunctional cytokine known to regulate inflammation, autoimmunity, cancer, and infection (1–5). TNF is synthesized and presented on the cell surface as a trimeric transmembrane protein that can be cleaved by TNF-$\alpha$ converting enzyme (TACE)[2] (2) protease to generate soluble TNF (solTNF). Both forms of TNF are known to induce cell signaling events, with transmembrane TNF (tmTNF) acting through cell-cell contacts to promote juxtacrine signaling and solTNF acting in a paracrine fashion. Mounting evidence from clinical observations in humans and experimental studies in rodents suggests that paracrine signaling by solTNF is associated with chronic inflammation (6, 7), whereas juxtacrine signaling by tmTNF plays an essential role in resolving inflammation (8–10) and maintaining immunity to pathogens including *Listeria monocytogenes* (11, 12) and *Mycobacterium tuberculosis* (13–16). It has been suggested that different signaling cascades induced by these two forms of TNF may explain the contrasting beneficial and detrimental roles of the cytokine seen in animal models and human diseases (2, 6, 17–19).

TNF sequestration by monoclonal anti-TNF Abs (infliximab and adalimumab) and the IgG1 Fc-TNF receptor (TNFR) 2 fusion protein (etanercept) has been a successful treatment strategy for several autoimmune diseases, including rheumatoid arthritis. These two classes of biologics effectively control disease progression and in some cases can induce remission. Their use has also been linked to serious adverse events such as congestive heart failure, demyelinating disease, and lupus (20). Most notably, the use of anti-TNF biologics has been associated with an increased risk of infection (20–24). A significant common feature of these biologics is that they inhibit both paracrine (solTNF) and juxtacrine (tmTNF) cell signaling (25–28). Taken together with the mouse genetic data, these findings suggest that a solTNF-selective inhibitor that spares tmTNF activity might inhibit inflammation without suppressing the immune response to infection.

A previous report described the invention of a novel class of anti-TNF biologics (DN-TNFs) that work through a unique dominant-negative mechanism (29). These engineered variants of human TNF neither bind to nor signal through the NF receptors TNFR1 or TNFR2, but rapidly exchange subunits with native TNF homotrimers to form inactive mixed heterotrimers, effectively eliminating native TNF. DN-TNFs inhibit multiple functions of TNF, including NF-$\kappa$B nuclear translocation and transcriptional activation and caspase-mediated apoptosis (29); they also reduce disease severity in rat models of arthritis and Parkinson's disease (30).

We now report that DN-TNFs are selective inhibitors of solTNF. DN-TNFs blocked solTNF paracrine signaling in numerous assays, including caspase activation in human and mouse cell lines and proinflammatory cytokine production in human whole blood. Absolute efficacy and mass potency in these assays were comparable to the Ab and decoy receptor classes of anti-TNF biologics. In contrast, DN-TNFs failed to

*Xencor, Monrovia, CA 91016; and †Institut Transgenose, Centre National de la Recherche Scientifique, Orléans, France

Received for publication March 16, 2007. Accepted for publication May 24, 2007.

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.

[1] Address correspondence and reprint requests to Dr. David E. Szymkowski, Xencor, 111 W. Lemon Avenue, Monrovia, CA 91016. E-mail address: david.szymkowski@xencor.com

[2] Abbreviations used in this paper: TACE, TNF-$\alpha$ converting enzyme; CAIA, collagen-antibody induced arthritis; CIA, collagen-induced arthritis; CHO, Chinese hamster ovary; DN-TNF, dominant-negative inhibitor of TNF; PEG, polyethylene glycol; solTNF, soluble TNF; tmTNF, transmembrane TNF.

Copyright © 2007 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/07/$2.00

Table I. *DN-TNF biologics: sequence modifications from native human solTNF*[a]

| DN-TNF | Tag[b] | Improves Expression (V1M) | Impairs Binding to TNFR1, TNFR2 | | | | | | Allows Site-Specific Pegylation (C69V, C101A, R31C)[c] | Improves In Vivo Half-Life (Mod C31)[d] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | L57Y | S86Q | Y87H | I97T | Y115Q | A145R | | |
| XENP246 | X | | | | | X | X | | | |
| XENP249 | X | | | X | | | X | | | |
| XENP257 | X | | X | | | | X | | | |
| XENP267 | X | | | | X | | | X | | |
| XENP268 | X | | | | | X | | X | | |
| XENP344 | | X | | | X | | | X | X | 5-kDa mPEG[e] |
| XENP345 | | X | | | | X | | X | X | 5-kDa mPEG[e] |
| XENP346 | | X | | | | X | | X | X | 10-kDa mPEG[e] |
| XENP1595 | | X | | | X | | | X | X | 10-kDa mPEG[e] |
| XENP1596 | | X | | | X | | | X | X | Ethyl |

[a] Sequence changes are based on 157-aa native human solTNF (UniProtKB/Swiss-Prot database entry P01375).
[b] N-terminal MHHHHHH.
[c] R31C also impairs TNFR binding.
[d] Posttranslational modification (Mod) of amino acid C31.
[e] mPEG, monomethoxy-polyethylene glycol (for clarity, mPEG is not included in indicated concentrations).

inhibit juxtacrine signaling mediated by tmTNF, whereas nonselective biologics retained activity in these assays. DN-TNF biologics were as effective as a decoy receptor in reducing inflammation in two mouse models of arthritis. However, treatment with DN-TNFs did not suppress the resistance of mice to *L. monocytogenes* infection as measured by survival, bacterial load, and histopathology, whereas nonselective inhibition by decoy receptor led to marked immunosuppression. Decoy receptors also sensitized mice expressing only tmTNF (tmTNF knockins) to *Listeria* infection, whereas a DN-TNF biologic did not, providing further in vivo evidence that DN-TNFs are selective inhibitors of solTNF.

## Materials and Methods

### *Preparation of anti-TNF biologics*

DN-TNF proteins were prepared, processed, and handled as described previously (29). Multiple DN-TNF variants were engineered and assessed in in vitro and in vivo studies. These variants contained different combinations of six key mutations that disrupt TNFR binding (see Table I). Additional mutations were introduced in some compounds to facilitate purification, improve expression, or permit site-specific pegylation for in vivo use. Etanercept, infliximab, and adalimumab were obtained from a pharmacy (RxUSA).

### *Soluble TNF production and signaling assays*

To measure solTNF signaling, increasing concentrations of TNF inhibitors were incubated with the indicated concentrations of recombinant human or mouse solTNF or mouse lymphotoxin $\alpha$ (R&D Systems) for 60 min at 37°C in PBS supplemented with 0.02% Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich). This time period (60 min) was chosen to assure complete interaction with TNF for all biologics based on a previous report that DN-TNFs exchanged efficiently with native TNF within 20 min (29). These mixtures were applied to either human U937 cells or mouse WEHI-13VAR cells in the presence of 1 $\mu$g/ml actinomycin D (ICN Pharmaceuticals). After an additional 3-h incubation, a fluorescently labeled caspase-3/7 substrate (DEVD-R110; Roche) was used as a marker of TNF-induced apoptosis (31). Physiologically produced and processed solTNF was generated by treating either human THP-1 cells or murine RAW264.7 cells with 1 $\mu$g/ml LPS (Sigma-Aldrich). Conditioned medium was harvested and solTNF was measured using a commercial anti-human or anti-mouse TNF ELISA kit. Conditioned medium was supplemented with TNF inhibitors and 0.02% Igepal CA-630 and incubated for 60 min at 37°C. These mixtures were then added to cells as described above to induce caspase signaling. Levels of caspase activation induced by human and mouse solTNF were comparable in human U937 and mouse WEHI-13VAR cells. To permit a direct comparison of the efficacy and potency of DN-TNFs and control biologics against murine and human TNF irrespective of potential differences in cell assay formats, caspase activity is expressed as relative units normalized to maximum velocity ($V_{max}$). To facilitate comparisons of different DN-TNF molecules, the polyethylene glycol (PEG) groups on several DN-TNF biologics (see Table I) are not included in the indicated concentrations. All protein concentrations are given by mass; to convert to molar concentrations, note the following molecular masses: DN-TNF biologics, 52 kDa; etanercept ~105 kDa; adalimumab, ~148 kDa; and infliximab, ~149 kDa.

### *Native TNF:DN-TNF heterotrimer detection*

Conditioned medium from LPS-treated RAW264.7 cells was supplemented with XENP267 and screened for native murine solTNF:DN-TNF heterotrimer formation using an indirect sandwich ELISA as previously described (29). ELISA plates were coated overnight with 2 $\mu$g/ml anti-mouse TNF Ab (BioSource International) and blocked the next day with BSA (ICN Pharmaceuticals). Conditioned medium samples were applied and heterotrimers detected with anti-penta-His Ab-biotin conjugate (Qiagen). Alkaline phosphatase-conjugated NeutrAvidin coupled with a luminescent enzyme substrate was used for detection. Under these conditions, the ELISA signal is produced exclusively from XENP267:mouse solTNF heterotrimers; control mixtures of etanercept and mouse solTNF are at background.

### *Transmembrane TNF production and signaling assays*

Standard molecular biology techniques were used to delete amino acids 77–89 from full-length human TNF to generate $\Delta$1–12proTNF (32). This construct was transiently transfected into Chinese hamster ovary (CHO) cells using Lipofectamine (Invitrogen Life Technologies); the next day the cells were trypsinized and transferred into 96-well plates to reduce well-to-well variation. After an overnight incubation with increasing doses of TNF inhibitors, U937 cells and 1 $\mu$g/ml actinomycin D were added; cells were cocultured for an additional 3 h to induce tmTNF-dependent caspase activity. No human solTNF bioactivity was detected under these experimental conditions. To generate endogenous mouse tmTNF, RAW264.7 cells were treated with 1 $\mu$g/ml LPS (Sigma-Aldrich) in the presence of 10 $\mu$M TACE inhibitor TAPI-2 (BIOMOL International). These cells were mixed with 1 $\mu$g/ml actinomycin D and U937 target cells to induce tmTNF-mediated caspase activity. No mouse solTNF bioactivity was detected under these experimental conditions. Caspase assay data are expressed as described above for solTNF assays; statistical analysis was by one-way ANOVA.

### *Microscopy for mouse tmTNF-induced caspase assay*

RAW264.7 cells were plated onto glass coverslips; the next day, the medium was replaced and cells were untreated, incubated with 1 $\mu$g/ml LPS (Sigma-Aldrich), or incubated with 1 $\mu$g/ml LPS and 10 $\mu$M TAPI-2 (BIOMOL International) for 1 h at 37°C. Cells were washed in PBS, placed on ice, and mixed with 5 $\mu$g/ml anti-mouse TNF Ab (R&D Systems) for an additional 1 h. Cells were maintained on ice during this incubation to minimize internalization of the Ag complex. Cells were then washed in PBS, fixed, and processed for microscopy as described by the Ab supplier. Epifluorescent imaging was done using an Eclipse TS100 (Nikon) equipped with a charge-coupled device camera (Media Cybernetics).

*Human whole blood culture*

Blood samples for the TNF-induced IL-8 assays were supplied by HemaCare Blood Services following protocols approved by its institutional review board. Blood was drawn from healthy donors by venipuncture and immediately aliquoted into vials containing endotoxin-free sodium heparin (Sigma-Aldrich). Whole blood cultures were performed in flat-bottom microtiter plates; reagents were prepared in PBS containing 0.1% endotoxin-free BSA (Sigma-Aldrich). For TNF inhibition studies, biologics were combined with human solTNF and incubated for 2 h at 37°C in PBS supplemented with 0.02% Igepal CA-630. These mixtures were diluted 20-fold, added to blood specimens, and incubated an additional 6 h. Triton X-100 was then added to a final concentration of 0.5% to lyse cells and release any cell-bound cytokines. IL-8 levels were measured using a commercial ELISA (R&D Systems). Dose-ranging studies with blood from multiple donors were first done to establish the optimal solTNF concentration for antagonist studies.

*Mouse collagen Ab-induced arthritis (CAIA) model*

Three mouse CAIA studies were performed by MD Biosciences following protocols approved by its institutional review board. Male BALB/c mice ($n = 8$/group) were treated prophylactically with TNF inhibitors or vehicle delivered i.p., s.c., or i.p. by osmotic pump. In the first study, mice were given daily i.p. injections of vehicle or 10 mg/kg XENP345, XENP346, XENP1595, or etanercept. Injections started on day −3 and continued to day 12. Experimental arthritis was induced on day 0 by i.v. injection of four anti-collagen mAbs (MD Biosciences) at 25 mg/kg each followed by 2.5 mg/kg LPS given i.p. 72 h later. Arthritis severity was measured in a blinded fashion by measuring hind paw thickness (average of left and right) using a digital caliper. The second study was conducted similarly, except that etanercept and XENP1595 were given at a lower dose and frequency (1.0 mg/kg every 3 days) using the projected clinical formulation and s.c. route. Injections started on day −1 and continued to day 14. In the pump study, 14-day osmotic pumps (Alzet) were primed, loaded, and surgically implanted i.p. on day −3 and replaced with a fresh pump on day 11 using standard methods. Pumps delivered either XENP1595 at 3, 10, or 30 mg/kg/day, etanercept at 10 mg/kg/day, or a vehicle control (PBS (pH 8.0) and 10% glycerol). Hind paw thickness was recorded by caliper as described above. Steady-state serum levels of DN-TNFs and etanercept were determined at the end of the study by using a custom sandwich ELISA for DN-TNFs and a commercial TNFR2 ELISA for etanercept. For all CAIA studies, statistical analysis of hind paw thickness data was by one-way ANOVA with Dunnett's posttest.

*Mouse collagen-induced arthritis (CIA) model*

Mouse CIA studies were performed by Washington Biotechnology following protocols approved by its institutional review board. Arthritis was induced in male DBA/1J mice by two s.c. injections of an emulsion containing 5 mg/kg bovine collagen in CFA on day 0 and in IFA on day 21. Disease onset was observed by day 27 and therapeutic dosing was begun on day 33. Mice ($n = 10$/group) were treated therapeutically s.c. with vehicle, XENP1595, or etanercept. Disease symptoms were measured by summing arthritis score from four paws (0, no visible effects of arthritis; 1, edema and/or erythema of one digit; 2, edema and/or erythema of two joints; 3, edema and/or erythema of more than two joints; and 4, severe arthritis of the entire paw and digits); statistical significance was assessed using a Kruskal-Wallis nonparametric test with Dunn's posttest for multiple comparisons.

*Generation of TNF knockout and tmTNF knockin mice*

Knockout mice deficient in TNF ($TNF^{-/-}$) and tmTNF knockin mice were bred and housed in a pathogen-free facility at the Centre National de la Recherche Scientifique (Orléans, France). tmTNF knockin mice expressing only tmTNF were generated directly on a C57BL/6 background by replacing the endogenous TNF allele with the Δ1–9,K11E TNF allele to ensure the complete loss of TACE-mediated cleavage but normal cell surface expression and function of tmTNF (7). TNF knockout mice were backcrossed onto the C57BL/6 background as described (12).

*Mouse infection model*

The initial *L. monocytogenes* infection survival studies in normal $TNF^{+/+}$ mice and in tmTNF knockin mice were performed at the Centre National de la Recherche Scientifique following protocols approved by its institutional review board. In the normal mouse study, vehicle or 30 mg/kg XENP345, XENP1595, or etanercept was administered s.c. on days −1 and 2 to C57BL/6 mice ($n = 6$/group) infected on day 0 with $10^4$ CFU *L. monocytogenes* i.v. as described (33). *L. monocytogenes*-infected TNF knockout and tmTNF knockin mice that were not treated with anti-TNF biologics were used as genetic controls. Survival and body weight were monitored and, in an additional four mice per satellite group, liver histology and bacterial load (CFU) were assessed 3 days after infection (33). In the tmTNF knockin study, mice ($n = 10$/group) were infected as described above and treated with vehicle or 10 mg/kg XENP1595 or etanercept s.c. on days −1, 2, 6, 9, and 13. *L. monocytogenes*-infected TNF knockout mice not treated with anti-TNF biologics served as genetic positive controls. Survival and bacterial load in the liver were monitored in an additional four mice per satellite group as described above.

Another *Listeria* survival study was performed by Washington Biotechnology following protocols approved by its institutional review board. Female BALB/c mice ($n = 8$/group) were injected i.p. daily with vehicle or 10, 30, or 50 mg/kg XENP1595 or etanercept. After three days, mice were food-deprived for 24 h and orally infected with *L. monocytogenes* at the doses indicated. Food was restored and TNF inhibitors were administered for an additional 3 days. Mice were then euthanized, and bacterial loads in spleen (total CFU) and blood (CFU/ml) were determined by standard methods. In all *Listeria* studies, survival data (Kaplan-Meier plots) were compared using a log rank test for comparison of groups, and bacterial load data were analyzed using a one-way ANOVA with Dunnett's posttest.

## Results

DN-TNFs contain key mutations that prevent binding and activation of TNFR1 and TNFR2 (29, 34) yet maintain their structural integrity and ability to rapidly exchange monomer subunits with native solTNF. When mixed with solTNF, DN-TNFs sequester and effectively eliminate native cytokine by forming inactive mixed heterotrimers. Table I shows the sequences of the 10 DN-TNF biologics described in this report, including the combinations of six key mutations that impair TNFR binding. Modifications made to enhance expression, allow site-specific pegylation, and improve half-life are also shown. The 10 DN-TNF variants fall into several groups possessing the same critical mutations that impair TNFR1 and TNFR2 binding (Table I). For example, XENP267, XENP344, XENP1595, and XENP1596 all include Y87H and A145R mutations to inhibit receptor binding and differ only in the presence or absence of an N-terminal tag or PEG side chain. Multiple DN-TNF variants were included in some studies to assess whether the results were unique to individual compounds or broadly associated with this class of biologics. The variants included in each study were selected based on the nature of the assay; typically, multiple variants were included for in vitro studies on human cells, and fewer were used for in vitro and in vivo mouse studies. For example, initial human in vitro studies tested multiple DN-TNF variants containing different TNFR binding mutations; all showed similar efficacy (Fig. 1, *A* and *C*). In subsequent studies, subsets of these variants were tested (e.g., pegylated variants were used in mouse models).

*DN-TNF biologics inhibit solTNF-induced caspase activation*

In previous studies we showed that DN-TNFs inhibit several TNF activities, including NF-κB transcriptional activation and nuclear translocation, and caspase-mediated apoptosis (29). In this study, we compared DN-TNF inhibition of solTNF activity via subunit exchange to the TNF sequestration mechanism of other biologics by using recombinant and endogenously produced solTNF as targets. A caspase activation assay in human cells was selected because it is a well-established and sensitive method for quantifying TNF bioactivity (35, 36). In preparation for in vivo pharmacology studies and to characterize the species-specificity of DN-TNF, an analogous cell signaling assay was developed using mouse TNF and TNFRs. U937 and WEHI-13VAR cells were chosen as human and murine target cell lines, respectively, because both have been shown to express TNFRs and both are sensitive to TNF-induced caspase activation (37–40). We have also confirmed by flow cytometry that U937 cells express TNFR1 and TNFR2 (data not shown).

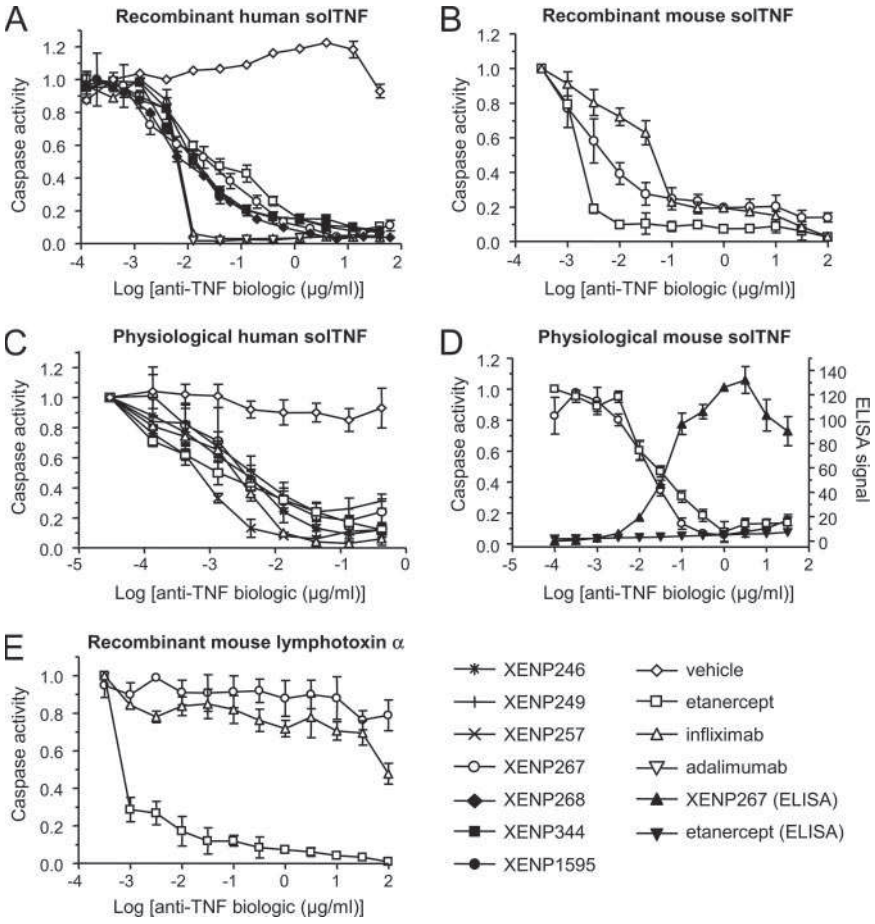



**FIGURE 1.** Inhibition of recombinant and physiological solTNF by DN-TNF biologics. *A*, Inhibition of recombinant human solTNF-induced cell signaling. Human solTNF (5 ng/ml) was incubated with vehicle or increasing concentrations of DN-TNFs (XENP267, XENP268, XENP344, and XENP1595), decoy receptor (etanercept), or neutralizing mAbs (infliximab and adalimumab) and then mixed with human U937 cells to induce caspase activity (mean ± SEM, $n$ = 4). $IC_{50}$ values: mAbs, 2 ng/ml; DN-TNFs, 11 ng/ml; etanercept, 20 ng/ml. *B*, Inhibition of recombinant mouse solTNF-induced cell signaling. Mouse solTNF (5 ng/ml) was incubated with increasing concentrations of XENP267, etanercept, or infliximab and then mixed with mouse WEHI-13VAR cells to induce caspase activity (mean ± SD, $n = 3$). $IC_{50}$ values: infliximab, 37 ng/ml; XENP267, 5 ng/ml; etanercept, 2 ng/ml. *C*, Inhibition of LPS-induced physiological human solTNF activity. Human THP-1 cells were stimulated with LPS to generate conditioned medium containing 6 ng/ml secreted solTNF. Conditioned medium was incubated with vehicle or increasing concentrations of DN-TNFs (XENP246, XENP249, XENP257, and XENP267), etanercept, or infliximab and then processed as described in *A* (mean ± SD, $n = 3$). $IC_{50}$ values: infliximab, 7 ng/ml; DN-TNFs, 0.5–8 ng/ml; etanercept, 2 ng/ml. *D*, Inhibition of LPS-induced physiological mouse solTNF activity. Conditioned medium from LPS-treated mouse RAW264.7 cells containing 10 ng/ml murine solTNF was incubated with increasing doses of XENP267 or etanercept. Mixtures were split and aliquots were used to stimulate caspase activation in human U937 cells, whereas the remainder was assayed for mouse TNF:DN-TNF heterotrimer formation by using a sandwich ELISA (mean ± SEM, $n = 3$). Caspase $IC_{50}$ values: XENP267, 14 ng/ml; etanercept, 36 ng/ml. Inhibitory activity of DN-TNF correlates with subunit exchange into endogenous mouse solTNF. *E*, DN-TNF and infliximab do not inhibit lymphotoxin α (solTNFβ) activity. Mouse recombinant lymphotoxin α (5 ng/ml) was incubated with increasing concentrations of XENP267, etanercept, or infliximab and then mixed with mouse WEHI-13VAR cells to induce caspase activity (mean ± SD, $n = 3$). $IC_{50}$ value: etanercept, <1.0 ng/ml.

In the human U937 cells, anti-TNF mAbs, decoy receptors, and multiple DN-TNF biologics inhibited recombinant human solTNF-induced caspase activation with similar maximal efficacy (Fig. 1*A*), with the two Abs being more potent by mass. In the murine cell line WEHI-13VAR, the three classes of TNF inhibitors also blocked recombinant mouse solTNF-induced caspase activation (Fig. 1*B*). Infliximab was less effective against mouse TNF relative to human TNF, probably due to the species-specificity of the Ab; this precluded its use in subsequent mouse models of arthritis and infection. The finding that a DN-TNF biologic derived from human solTNF is an effective antagonist of mouse solTNF is in agreement with published observations showing that human solTNF can exchange subunits with mouse solTNF to form heterotrimers (41).

TNF is naturally produced as a transmembrane protein that is processed by TACE to generate solTNF. Because solTNF produced in *Escherichia coli* is posttranslationally processed differently than in human or mouse cells (e.g., mouse solTNF is glycosylated), it was important to demonstrate DN-TNF inhibition against endogenously produced solTNF. LPS was therefore used to induce the production of physiological human or mouse solTNF. Briefly, human THP-1 cells or mouse RAW264.7 cells were treated with LPS, the conditioned medium was collected, and solTNF levels were determined by ELISA. The conditioned medium was then supplemented with increasing concentrations of TNF inhibitors and used to stimulate caspase activation in U937 cells. The three classes of TNF inhibitors showed similar activity against endogenously produced human solTNF (Fig. 1*C*). Similar results were obtained with mouse TNF; etanercept and DN-TNF inhibited endogenous mouse solTNF to a similar extent (Fig. 1*D*, *left axis*). In addition, a sandwich ELISA was used in this study to demonstrate that DN-TNF activity correlates with heterotrimer formation between DN-TNF and mouse solTNF (Fig. 1*D*, *right axis*).

Because many proteins in the TNF superfamily share conserved structural features, it was important to determine whether the exchange mechanism of DN-TNF is specific for TNF; therefore, a signaling assay was established to measure inhibition of lymphotoxin $\alpha$ (solTNF$\beta$), the most closely related cytokine. As described above, the three classes of TNF inhibitors blocked recombinant mouse solTNF (Fig. 1*B*). However, DN-TNF and Ab failed to block recombinant mouse lymphotoxin $\alpha$ (each showed a >1000-fold loss of potency relative to solTNF), whereas the decoy receptor retained activity (Fig. 1*E*) in agreement with a previous report (26). Taken together, the five studies shown in Fig. 1 demonstrate that DN-TNF biologics effectively antagonize recombinant or endogenously produced solTNF with comparable overall efficacy to that of a decoy receptor and anti-TNF Abs; however, DN-TNF does not block the activity of lymphotoxin $\alpha$.

### *DN-TNF biologics do not inhibit tmTNF-induced caspase activation*

Based on the structural differences between solTNF and tmTNF, we reasoned that solTNF might dissociate more readily than the membrane-bound form and, thus, a DN-TNF biologic might be a less effective inhibitor of tmTNF. To test this hypothesis, we developed a heterologous tmTNF expression system to quantify the effects of DN-TNF biologics on tmTNF-induced juxtacrine signaling. Such heterologous cocultures are established tools for assessing tmTNF bioactivity and its inhibition by biologics (26, 42). Expression of both human and mouse tmTNF was elicited in cell lines, and signaling was again monitored by using caspase activation in human U937 target cells.

Briefly, to generate human tmTNF-expressing cells, CHO cells were transfected with a human TNF construct lacking the TACE cleavage site ($\Delta$1–12proTNF), thus generating bioactive tmTNF that is not shed from the cell surface (26, 32). These tmTNF-expressing cells were incubated overnight with increasing concentrations of TNF inhibitors and cocultured the next day with U937 target cells. In this system, human tmTNF on CHO cells engages human TNFRs on U937 cells to stimulate caspase activity 3- to 4-fold over background. In agreement with the literature (25–28), mAbs and decoy receptors inhibited human tmTNF-induced caspase activation ($IC_{50}$ values in this assay were ~0.12 $\mu$g/ml for the mAbs and ~1.2 $\mu$g/ml for etanercept). In contrast, DN-TNF biologics failed to inhibit tmTNF-induced activation even at >100 $\mu$g/ml (Fig. 2*A*), which is ~10,000-fold greater than the DN-TNF dose shown to effectively inhibit human solTNF (Fig. 1, *A* and *C*). Control experiments were conducted to confirm that no solTNF is generated by $\Delta$1–12proTNF-transfected CHO cells (Fig. 2*B*) and to demonstrate that caspase activation is detectable above background only when human tmTNF-expressing CHO cells (but not mock-transfected cells) are mixed with human U937 target cells (Fig. 2*C*).

Similar results were obtained in cocultures by using cells expressing murine tmTNF. LPS-stimulated mouse RAW264.7 cells were treated with TAPI-2, a small-molecule TACE inhibitor that traps uncleaved tmTNF on the cell surface (43). These mouse tmTNF-expressing cells were incubated with TNF inhibitors and cocultured with human U937 target cells to induce caspase activation as described above. In this juxtacrine signaling assay, 10 $\mu$g/ml DN-TNF had no effect on murine tmTNF-mediated caspase activation, whereas decoy receptor and anti-mouse TNF Ab reduced caspase activation to background levels (Fig. 3*A*). Controls for this assay were also performed to confirm that no solTNF is generated in the medium (Fig. 3*B*) and that tmTNF is expressed at high levels on the RAW264.7 cell membrane (Fig. 3, *C–E*) only in the presence of LPS and TAPI-2.

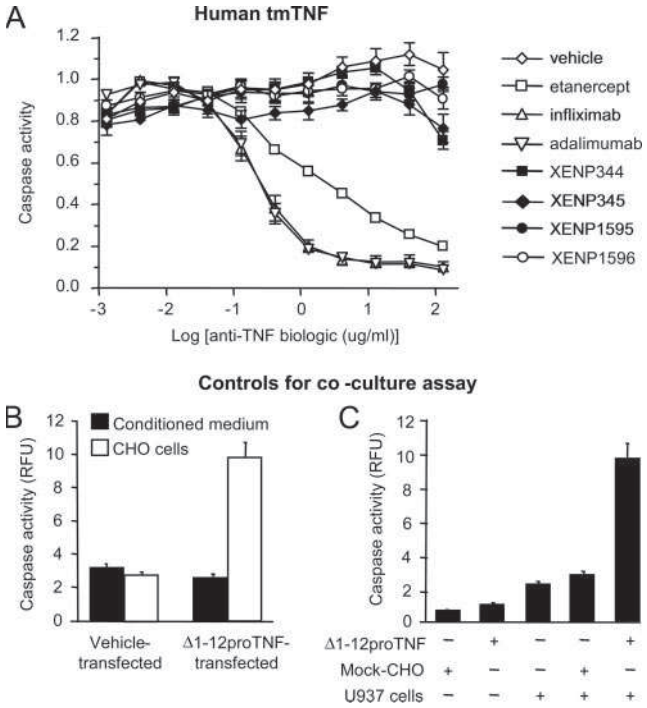



**FIGURE 2.** DN-TNFs do not inhibit activity of heterologously expressed human tmTNF. *A*, CHO cells expressing human tmTNF lacking a TACE cleavage site ($\Delta$1–12proTNF) were incubated overnight with vehicle or increasing concentrations of DN-TNFs, etanercept, infliximab, or adalimumab. U937 cells were added and cocultured an additional 3 h to induce caspase activation via juxtacrine signaling. Etanercept and mAbs inhibited tmTNF-induced caspase activation, whereas four DN-TNFs did not (mean ± SEM, $n = 6$). $IC_{50}$ values: infliximab and adalimumab, 120 ng/ml; etanercept, 1170 ng/ml. *B* and *C*, Controls for human $\Delta$1–12proTNF coculture assays. To correctly interpret the results of the CHO and U937 cell coculture assays, it was necessary to determine: 1) whether detectable solTNF was generated by human $\Delta$1–12proTNF-transfected CHO cells; and 2) the background contribution of each cell type to caspase activity measured during the coculture. *B*, Coculture assay in which CHO cells were either mock transfected with vehicle or transfected with the $\Delta$1–12proTNF expression construct. U937 cells were incubated with either CHO cells or with conditioned medium obtained from the same CHO cells. Only CHO cells expressing $\Delta$1–12proTNF protein induced caspase activity in U937 cells; no detectable TNF activity was present in conditioned medium from $\Delta$1–12proTNF-transfected CHO cells or mock-transfected controls. *C*, Background effect of CHO and U937 cells on the tmTNF coculture assay. CHO cells alone, U937 cells alone, $\Delta$1–12proTNF-transfected CHO cells alone, and coculture of mock-transfected CHO cells plus U937 cells established background levels of caspase activity. Coculture of $\Delta$1–12proTNF-transfected CHO plus U937 cells stimulated a 3- to 4-fold increase in caspase activity over controls. All experimental procedures were as described in *Materials and Methods*. For *B* and *C*, values represent mean ± SD ($n = 24$).

These findings indicate that the DN-TNF class of inhibitors is highly selective for solTNF whether of human or mouse origin and whether recombinantly or physiologically produced. Unlike other classes of TNF inhibitors, DN-TNF biologics do not inhibit solTNF$\beta$ or tmTNF. Based on these observations, DN-TNF biologics are suitable tools to explore the role of solTNF in primary human cell assays as well as in mouse models of inflammation and immunity.

### *DN-TNF biologic inhibits solTNF-induced release of IL-8 in human blood*

Translational studies were performed using a human whole blood assay to assess the anti-inflammatory effects of DN-TNF. This assay has previously been used to show that anti-TNF agents, including decoy receptor and mAbs, suppress TNF-induced IL-8

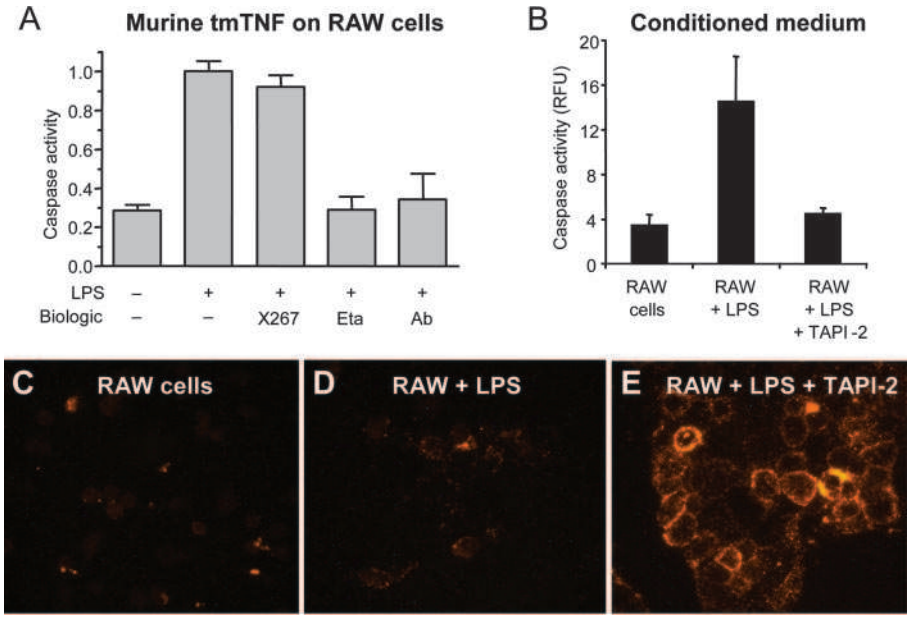



**FIGURE 3.** DN-TNF does not inhibit mouse tmTNF activity on human TNF receptors. *A*, Mouse RAW264.7 (RAW) cells were treated with 1 $\mu$g/ml LPS in the presence of 10 $\mu$M TACE inhibitor TAPI-2 to generate cells expressing tmTNF. Cells were incubated with 10 $\mu$g/ml XENP267 (X267), etanercept (Eta), or anti-mouse TNF neutralizing Ab (Ab) and then cocultured with human U937 cells to induce caspase activity. All columns contain RAW264.7 and U937 cells plus TAPI-2; differing LPS and biologics treatments are as shown. Etanercept and Ab decreased activity to background levels while DN-TNF had no effect (mean $\pm$ SEM, $n = 18$; $p < 0.01$ for etanercept and Ab vs vehicle). *B–E*, Controls for murine tmTNF coculture assays. *B*, U937 caspase assay using conditioned medium obtained from untreated, LPS-treated, or LPS- and TAPI-2-treated RAW264.7 cells. The addition of TAPI-2 to LPS-treated cells effectively inhibits the production of solTNF (mean $\pm$ SD, $n = 6$). *C–E*, Endogenously expressed murine TNF is trapped on the surface of LPS-stimulated RAW264.7 cells treated with TACE inhibitors. RAW264.7 cells were untreated (*C*), incubated with 1 $\mu$g/ml LPS to induce TNF (*D*), or incubated with 1 $\mu$g/ml LPS and 10 $\mu$M TACE inhibitor TAPI-2 (*E*). In the absence of LPS no TNF is produced (*C*); in the presence of LPS there is only a slight increase in cell surface TNF (*D*) because as TNF is expressed it is processed by TACE and shed into the medium as solTNF. LPS stimulation combined with TACE inhibition generates a significant amount of tmTNF trapped on the surface of these cells (*E*). All caspase procedures were as described in *Materials and Methods*.

release (44, 45). It therefore serves as an independent confirmation of the caspase assays shown in Fig. 1 and, more importantly, assesses the effects of DN-TNF on primary immune cells in the complex signaling environment of human whole blood. To determine the donor variability of solTNF-induced cytokine release, blood was collected from five human donors and treated with escalating doses of recombinant human solTNF (Fig. 4*A*). All donors responded with maximal IL-8 release ranging from 3 to 7.5 ng/ml, with $EC_{50}$ values ranging from ~1 to 6 ng/ml TNF. Based on these results, inhibition studies were done in five additional donors using 3 and 6 ng/ml solTNF with increasing doses of DN-TNF, anti-TNF Abs, or decoy receptor. In agreement with the caspase assays described above, DN-TNF efficacy and mass potency were similar to that of other TNF inhibitors, demonstrating that in a physiologically relevant whole blood environment anti-TNF agents efficiently block IL-8 release, regardless of inhibitory mechanism (Table II and Fig. 4*B*).

### *DN-TNF biologics reduce inflammation in two mouse models of arthritis*

To assess the in vivo anti-inflammatory activity of solTNF-selective inhibition, DN-TNFs were investigated in two established mouse models of arthritis. In the first model (collagen Ab-induced arthritis (CAIA); Fig. 5), mice were treated prophylactically with TNF inhibitors, and experimental arthritis was induced by passive immunization using a mixture of four anti-collagen mAbs on day 0 followed by LPS on day 3. The severity of arthritis was monitored throughout the study by measuring hind paw thickness. This model has the advantages of being rapid (7 days to the peak of inflammation) and robust in arthritic phenotype, with typically 100% incidence of affected animals (46, 47); furthermore, inhibition of TNF by biologics is efficacious in this model (48).

Four independent studies were performed to determine DN-TNF efficacy in the CAIA model; these studies used different DN-TNF biologics, dosing regimens, and routes of administration (i.p., s.c., and i.p. by osmotic pump). All arthritis studies included etanercept as a positive control. Results were consistent for all four studies as measured by hind paw edema and arthritis score; representative edema data from three of these studies are discussed below (arthritis score data not shown). In the first study, three DN-TNFs given daily at 10 mg/kg i.p. reduced hind paw inflammation compared with vehicle (Fig. 5*A*). Note that vehicle is an appropriate control for DN-TNF agents because these biologics are variants of human solTNF and therefore do not possess Ab Fc domains and their associated effector functions. The decoy receptor etanercept, administered using the same dosing regimen, also reduced hind paw inflammation to a similar extent as that by DN-TNF compounds.

Several DN-TNF biologics were pegylated to improve in vivo half-life (29), allowing less frequent dosing. In the second CAIA study (Fig. 5*B*), we found that a pegylated DN-TNF was efficacious when given s.c. at one-tenth the dose and one-third the frequency used in Fig. 5*A*. Histological examination of bone and cartilage at day 28 showed a trend toward reduced pathology (scores for bone and cartilage were decreased by 24–29% with both DN-TNF and etanercept), although differences among all groups were not statistically significant at this early time point (data not shown). Longer studies are necessary to determine whether inhibition of acute inflammation in the CAIA

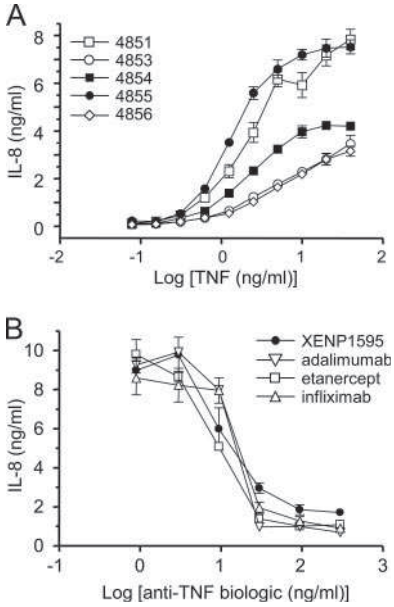



**FIGURE 4.** DN-TNF biologic inhibits solTNF-induced release of IL-8 in human blood. *A*, TNF dose responses for induction of IL-8 release in whole blood from multiple human donors. Fresh whole blood was obtained from five human donors; IL-8 release after solTNF treatment was then determined as described in the *Materials and Methods* (mean ± SEM, $n = 3$). The absolute level of solTNF-induced IL-8 release varied among donors; $EC_{50}$ values ranged from 1 to 6 ng/ml TNF. *B*, Inhibition of solTNF-induced IL8 release. Recombinant human solTNF (3 ng/ml) was incubated with increasing amounts of XENP1595, etanercept, infliximab, or adalimumab and then mixed with human whole blood for 6 h at 37°C. Blood cells were lysed with Triton-X100 and IL-8 production was determined by sandwich ELISA (mean ± SEM, $n = 4$). Donor shown is number 5134 from Table II; see the table for $IC_{50}$ values for whole blood assays of five human donors.

model by DN-TNFs will translate into reduced bone and cartilage degradation.

To address potential differences in pharmacokinetics among different classes of anti-TNF biologics, a third CAIA study was done using osmotic pumps to deliver inhibitors. Pump delivery provides a constant infusion of drug and allows better correlation of steady-state blood levels and inflammation endpoints. Three increasing doses of DN-TNF caused a progressive reduction in inflammation, with decoy receptor at 10 mg/kg showing comparable activity to the same dose of DN-TNF. Proportional increases in serum DN-TNF levels at 3, 10, and 30 mg/kg (measured at the end of the

Table II. *Inhibition of TNF-induced IL-8 release in human whole blood by anti-TNF biologics*

| | $IC_{50}$ (ng/ml) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Donor | 5129 | 5131 | 5132 | 5133 | 5134 | Mean ± SD |
| 3 ng/ml TNF | | | | | | |
| XENP1595 | 15.5 | 6.8 | 17.1 | 11.8 | 11.5 | 12.5 ± 4.0 |
| Etanercept | 13.7 | 10.9 | 10.7 | 9.7 | 9.1 | 10.8 ± 1.8 |
| Adalimumab | 15.9 | 14.6 | 19.2 | 15.3 | 13.4 | 15.4 ± 2.2 |
| Infliximab | 19.5 | 16.2 | 16.5 | 16.5 | 19.5 | 17.5 ± 1.7 |
| 6 ng/ml TNF | | | | | | |
| XENP1595 | 61.4 | 25.0 | 36.3 | 28.8 | 26.0 | 35.5 ± 15.1 |
| Etanercept | 26.9 | 26.2 | 27.1 | 17.9 | 17.2 | 23.1 ± 5.0 |
| Adalimumab | 47.5 | 34.4 | 89.3 | 46.5 | 41.0 | 51.7 ± 21.6 |
| Infliximab | 45.0 | 39.4 | 69.3 | 45.1 | 39.5 | 47.7 ± 12.4 |

Values are mean $IC_{50}$ ($n = 4$) from a six-point dose response as shown in Fig. 4*B* for donor 5134.

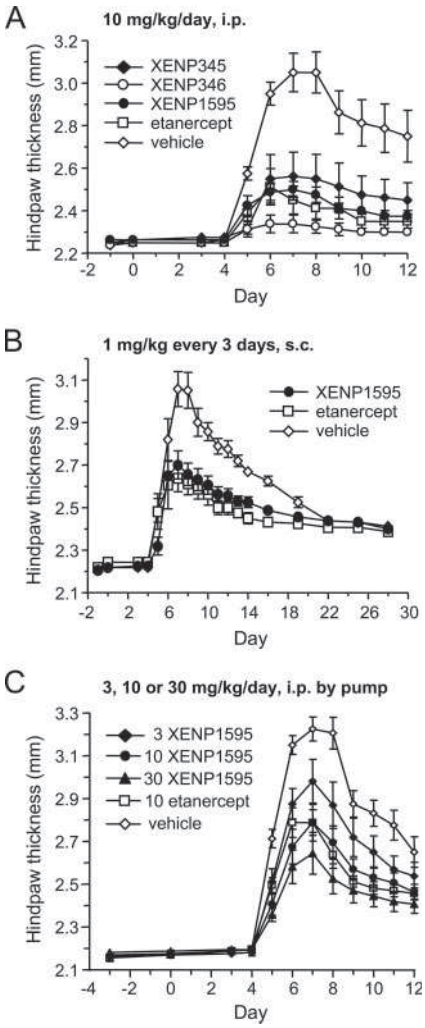



**FIGURE 5.** DN-TNFs and decoy receptor reduce arthritis in the mouse collagen Ab-induced arthritis model. *A*, Intraperitoneal route, prophylactic dosing. Beginning on day −3, mice ($n = 8$/group) were dosed daily i.p. with vehicle or 10 mg/kg etanercept or DN-TNF (XENP345, XENP346, or XENP1595). Joint inflammation was stimulated by i.v. injection of 25 mg/kg each of four anti-collagen Abs on day 0, followed by 2.5 mg/kg LPS i.p. on day 3. DN-TNFs and etanercept significantly reduced disease symptoms as measured by hind paw thickness (mean ± SEM): XENP345, 61.4% reduction in area under the curve; XENP346, 88.6%; XENP1595, 72.4%; and etanercept, 74.8% ($p < 0.01$ for all groups vs vehicle). At the time of sacrifice, drug levels were measured and found to be as follows: XENP345, 0.8 ± 0.4; XENP346, 4.2 ± 3.5; XENP1595, 7.0 ± 4.6; and etanercept, 35 ± 11 μg/ml. *B*, Subcutaneous route, prophylactic dosing. Beginning on day −3, mice ($n = 8$/group) were dosed s.c. every 3 days with vehicle or 1.0 mg/kg etanercept or XENP1595. Experimental arthritis was induced as in *A* and hind paw thickness (mean ± SEM) was monitored for 28 days. XENP1595 and etanercept significantly reduced hind paw thickness compared with vehicle-treated controls: XENP1595, 35.6% reduction; etanercept, 46.9% ($p < 0.01$ for both groups vs vehicle area under the curve). *C*, Dose response to DN-TNF treatment. Mice were implanted on day 3 with osmotic pumps to deliver vehicle, 10 mg/kg/day etanercept, or XENP1595 at 3, 10, or 30 mg/kg/day i.p. Experimental arthritis was induced as in *A*; disease symptoms were measured using hind paw thickness (mean ± SEM), and serum drug levels were measured at the conclusion of the study by using a sandwich ELISA. DN-TNF rescued mice from arthritic symptoms in a dose-dependent manner: XENP1595 at 3, 10, and 30 mg/kg/day = 10.9, 27.5, and 39.1% reduction; etanercept at 10 mg/kg/day = 26.8% reduction ($p < 0.05$ vs vehicle for all groups except 3 mg/kg XENP1595). Average steady-state serum levels were 7.0 ± 4.1, 24.6 ± 7.1, and 220 ± 161 μg/ml for the 3, 10, and 30 mg/kg/day dose levels of XENP1595 and 14.6 ± 13.1 μg/ml for etanercept (mean ± SD).

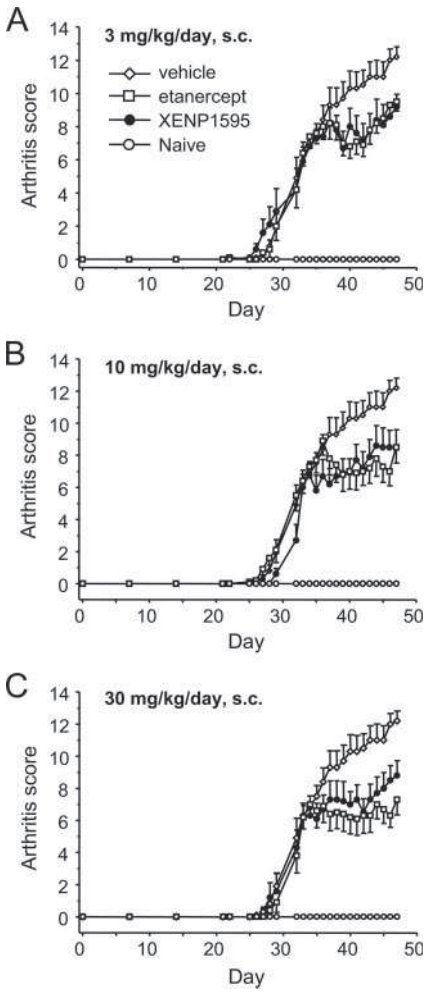



**FIGURE 6.** DN-TNF and decoy receptor reduce arthritis in the mouse collagen-induced arthritis model. Arthritis was induced using a 5 mg/kg s.c. administration of bovine collagen type II on days 0 and 21. Joints were inflamed by day 27 and therapeutic dosing was begun on day 33 using vehicle, XENP1595, or etanercept at 3, 10, and 30 mg/kg/day s.c. in panels *A*, *B*, and *C*, respectively. Untreated animals served as a baseline. Disease symptoms were measured using the sum of arthritis scores (0–4) from four paws (mean ± SEM, $n = 8$/group). Biologics were efficacious at doses of 3, 10, and 30 mg/kg, reducing the area under the curve (using start of dosing as baseline) relative to vehicle by 55, 67, and 68% for XENP1595 and 53, 63, and 86% for etanercept ($p < 0.05$ for 10 and 30 mg/kg XENP1595 and $p < 0.001$ for 30 mg/kg etanercept; there were no significant differences between XENP1595 and etanercept at any dose).

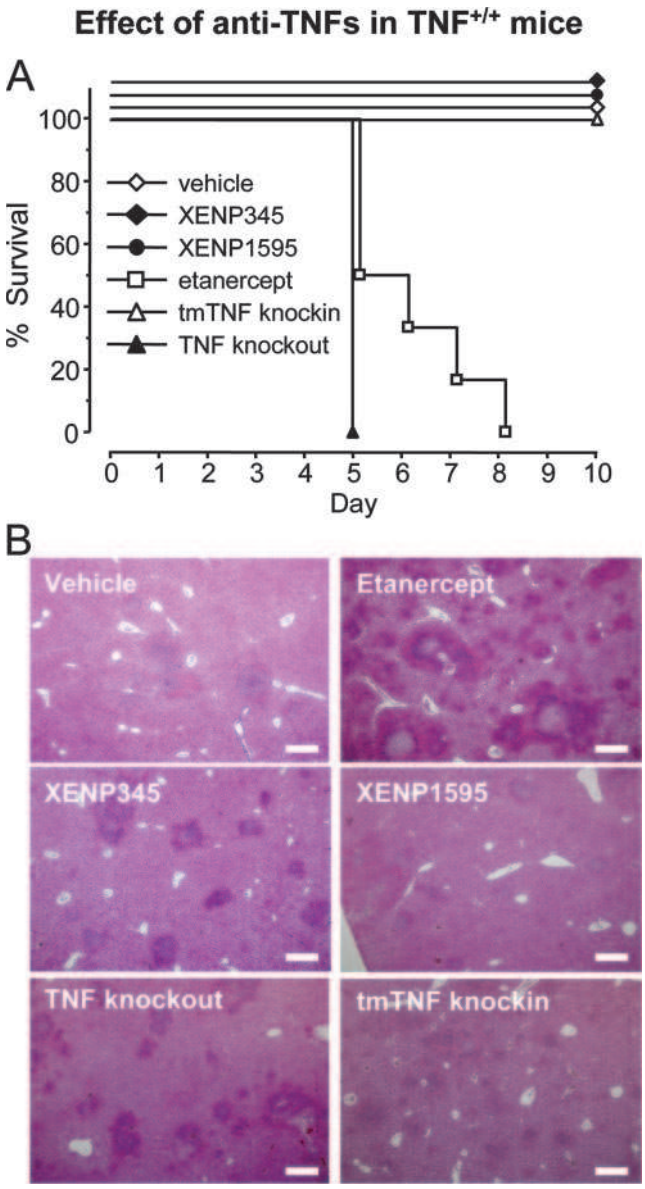



**FIGURE 7.** Selective inhibition of solTNF by DN-TNFs does not increase mortality of $TNF^{+/+}$ mice after *Listeria* challenge. C57BL/6 mice were given two s.c. doses (days −1 and 2) of vehicle or 30 mg/kg XENP1595, XENP345, or etanercept. *L. monocytogenes* ($10^4$ CFU) was administered i.v. to all mice on day 0. *Listeria*-infected TNF knockout and tmTNF knockin mice not treated with TNF inhibitors were used as genetic controls. Survival was monitored for 10 days (*A*, $n = 6$/group), and liver histology (*B*, $n = 4$ per group) was assessed 3 days after infection. In *A*, survival in etanercept and TNF knockout groups is significantly reduced relative to vehicle, tmTNF knockin, and XENP1595 groups ($p < 0.005$). In *B*, note the increased size and number of liver microabscesses (darker regions) in the etanercept-treated group. Scale bars, 1 mm.

study) correlated with efficacy (Fig. 5*C*). These results suggest that in the mouse the comparable efficacy of DN-TNF and decoy receptor can be attributed to solTNF inhibition at similar systemic drug exposures.

CIA is another established experimental arthritis model and has been used to demonstrate anti-inflammatory activity of Ab and decoy receptor anti-TNF biologics (49–51). In previous studies we showed that DN-TNFs are anti-inflammatory in the rat CIA model when dosed soon after the onset of symptoms (29). To extend these observations, DN-TNF was investigated in an advanced CIA mouse model. An aggressive dosing strategy was adopted; animals were permitted to develop advanced disease before TNF inhibitors were administered therapeutically on day 33, 5 to 7 days after a detectable increase in the arthritis score. Fig. 6 shows that DN-TNF at 3, 10, and 30 mg/kg given daily s.c. suppressed arthritis score comparably to decoy receptor, indicating that inhibition of tmTNF by a decoy receptor generates no additional anti-inflammatory activity relative to selective inhibition of solTNF. For DN-TNF, the 10 and 30 mg/kg groups showed significant reductions ($p < 0.05$); for etanercept, only the 30 mg/kg group achieved significance ($p < 0.001$). The dose response for both compounds was modest, possibly because drugs were dosed therapeutically in advanced disease rather than prophylactically. There was no significant difference in the histopathology of bone and cartilage for any treatment group vs vehicle; as with the CAIA studies above, longer studies are required to determine whether the

Table III. *Effect of treatment with anti-TNF biologics on* L. monocytogenes *load in mice 3 days postinfection*[a]

| *Listeria* Dose (CFU, Oral) | $3.9 \times 10^9$ | $1.0 \times 10^{10}$ | $3.2 \times 10^{10}$ |
|---|---|---|---|
| Spleen (CFU $\times 10^4$) | | | |
| Vehicle | 5 ± 1 | 8 ± 1 | 16 ± 5 |
| XENP1595 (10 mg/kg) | 5 ± 4 | 7 ± 1 | 16 ± 5 |
| XENP1595 (30 mg/kg) | 10 ± 4 | 6 ± 1 | 21 ± 9 |
| XENP1595 (50 mg/kg) | 18 ± 5 | 53 ± 13 | 8 ± 2 |
| Etanercept (10 mg/kg) | 460 ± 230* | 720 ± 390* | 2,700 ± 1,300*** |
| Etanercept (30 mg/kg) | 650 ± 270* | 730 ± 350** | 170 ± 70 |
| Etanercept (50 mg/kg) | 25,000 ± 19,700*** | 330 ± 110* | 190 ± 60* |
| Blood (CFU/ml) | | | |
| Vehicle | 13 ± 8 | 3 ± 3 | 5 ± 5 |
| XENP1595 (10 mg/kg) | 5 ± 5 | 0 ± 0 | 18 ± 18 |
| XENP1595 (30 mg/kg) | 13 ± 13 | 8 ± 8 | 25 ± 17 |
| XENP1595 (50 mg/kg) | 10 ± 10 | 0 ± 0 | 3 ± 3 |
| Etanercept (10 mg/kg) | 370 ± 190* | 140 ± 54* | 1,655 ± 410** |
| Etanercept (30 mg/kg) | 315 ± 160 | 138 ± 36** | 1,306 ± 300** |
| Etanercept (50 mg/kg) | 4,900 ± 4,200*** | 88 ± 21* | 1,903 ± 420** |

[a] Values are mean ± SEM ($n = 8$); see Fig. 8 for data on individual mice.
*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

acute anti-inflammatory effects in CIA will result in reduced joint damage at later time points.

These in vivo pharmacology studies demonstrate that DN-TNF biologics are anti-inflammatory in well-characterized murine models of arthritis, showing comparable activity to that of a nonselective anti-TNF agent. The similar results seen for solTNF-selective inhibition relative to nonselective solTNF and tmTNF inhibition further suggest that solTNF is the major contributor to inflammation in these experimental models.

*DN-TNF biologics maintain immunity to* Listeria *infection in normal and tmTNF knockin mice*

Genetic evidence has shown that TNF knockout mice are immunosuppressed and therefore sensitized to mycobacterial and listerial infection, whereas normal mice or mice expressing tmTNF exclusively (tmTNF knockins) mount a sufficient immune response to delay or overcome infection (10–14, 16, 52). One hypothesis suggested by these genetic data is that a solTNF-selective

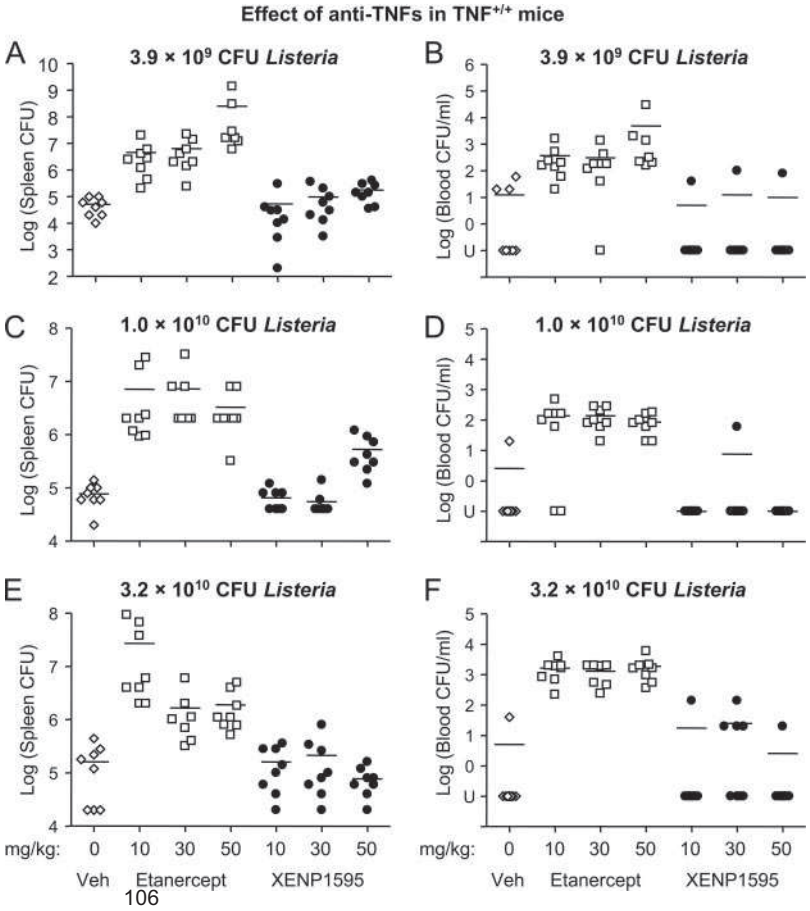



**FIGURE 8.** Effect of selective solTNF and nonselective TNF inhibition on innate immunity to *Listeria* challenge. Female BALB/c mice ($n = 8$/group) were dosed daily i.p. with vehicle (Veh) or 10, 30, or 50 mg/kg of either etanercept or XENP1595. On day 4, mice were orally infected with $3.9 \times 10^9$ (*A* and *B*), $1.0 \times 10^{10}$ (*C* and *D*), or $3.2 \times 10^{10}$ (*E* and *F*) CFU of *L. monocytogenes*. On day 7, mice were euthanized and their spleens (*A*, *C*, and *E*) and blood (*B*, *D*, and *F*) were evaluated for bacterial load (bars represent means; U, undetectable). See Table III for *p* values for each group. Regardless of bacterial inoculum or dose of biologic, etanercept increased CFUs in blood and spleen relative to vehicle and XENP1595 groups.

and tmTNF-sparing anti-inflammatory biologic would similarly preserve innate immunity to infectious challenge, whereas a nonselective TNF inhibitor would not. We tested this hypothesis in mice treated with DN-TNFs or a decoy receptor to determine whether either class of biologic compromised innate immunity to bacterial infection. *L. monocytogenes* was chosen as the model in part because it has been the organism of choice for previous TNF genetic studies. In addition, *Listeria* is an intracellular pathogen that causes granulomatous inflammation and is a risk factor associated with the clinical use of nonselective anti-TNF biologics (20, 21), yet this organism does not require the containment facilities and extended time periods necessary for *M. tuberculosis* models.

The effects on survival of two DN-TNFs and decoy receptor were first determined in normal $TNF^{+/+}$ mice. Vehicle or TNF inhibitors were administered s.c. on day −1 and day 2 to mice infected i.v. on day 0 with $10^4$ CFU *L. monocytogenes*. TNF knockout and tmTNF knockin mice not treated with anti-TNF agents were used as genetic controls. Survival was monitored for 10 days and liver histology was assessed in satellite groups 3 days after infection. The two DN-TNFs did not suppress host resistance to challenge relative to the vehicle (Fig. 7*A*). In contrast, all six mice treated with decoy receptor died by day 8. As expected, all TNF knockout controls died by day 5, whereas knockin mice expressing only tmTNF were fully protected. Histological assessment of livers revealed an increase in the size and number of microabscesses in the decoy receptor-treated group (Fig. 7*B*); livers from mice treated with DN-TNFs appeared similar to those from tmTNF knockins. These results indicate that inhibition of tmTNF, whether genetically via knockout or pharmacologically by treatment with nonselective biologic, results in sensitization of mice to *Listeria* infection. In contrast, inhibition of solTNF alone, whether genetically in tmTNF knockin mice or pharmacologically by DN-TNF, does not suppress innate immunity.

To investigate whether the preservation of immunity to *Listeria* was a simple dosage effect that could be overwhelmed by increasing infectious challenge and/or TNF inhibition, we extended the study using higher doses of both *Listeria* and anti-TNF biologics. Groups were orally inoculated with three increasing doses of *Listeria*. Starting 3 days before infection, vehicle, DN-TNF, or decoy receptor was given daily i.p. at 10, 30, or 50 mg/kg. All eight mice per group were sacrificed on day 3 postinfection, and bacterial loads were determined in spleen and blood. At all *Listeria* doses the decoy receptor greatly increased the bacterial load in both the spleen (~10- to 5000-fold) and blood (~25- to 400-fold), whereas DN-TNF-treated mice were comparable to the vehicle-treated controls (Table III). There is a statistically insignificant small increase in spleen bacterial load in one XENP1595-treated group at the middle inoculum of *Listeria* (Fig. 8*C*); however, all mice in this group had undetectable levels of *Listeria* in the blood (Fig. 8*D*), and this result was not repeated in the low or high inoculum groups (Fig. 8, *A* and *E*). Two of 72 decoy receptor-treated mice died before day 3, whereas all 24 vehicle- and 72 DN-TNF-treated mice survived. Because *Listeria* is an intracellular pathogen, detectable listeremia is evidence of an uncontrolled infection. Notably, although all mice had detectable bacterial loads in the spleen (Fig. 8, *A*, *C*, and *E*), few of the DN-TNF (10 of 72) or vehicle-treated mice (5 of 24) had any detectable bacteria in the blood, whereas almost all (67 of 70) of the etanercept-treated mice did, regardless of *Listeria* inoculum or drug dose (Fig. 8, *B*, *D*, and *F*). These results indicate that DN-TNF-treated mice mounted an innate immune response indistinguishable from that of vehicle-treated control mice.

TmTNF knockin mice serve as a useful model for dissecting the functions of solTNF and tmTNF in immunity and for investigating possible differential effects of anti-TNF biologics on these two ligands. *Listeria* infection studies were therefore next performed in tmTNF knockin mice to determine whether the immunosuppression observed with decoy receptor in $TNF^{+/+}$ mice could be reproduced in the absence of solTNF. tmTNF knockin mice were treated with vehicle or 10 mg/kg DN-TNF or decoy receptor twice weekly s.c., and infected i.v. with $10^4$ *Listeria* the day after the first drug dose. All DN-TNF and vehicle-treated mice survived to the end of the study (Fig. 9*A*). In contrast, six of 10 mice in the decoy receptor-treated group died by day 7. As controls, TNF knockouts were also infected and, as expected, all died by day 6. In a satellite study with four mice per group, similar results were observed for the bacterial load in the liver at day 3, with a 23-fold increase in CFU in decoy receptor-treated mice compared with the vehicle and a 13-fold increase compared with DN-TNF-treated mice (Fig. 9*B*). In addition, liver microabscess sizes were significantly increased in the TNF knockout and decoy receptor-treated groups (not shown). These results demonstrate that decoy receptor sensitized mice to *Listeria* even in the absence of solTNF and further support the hypothesis that DN-TNF has no effect on tmTNF-dependent innate immunity.

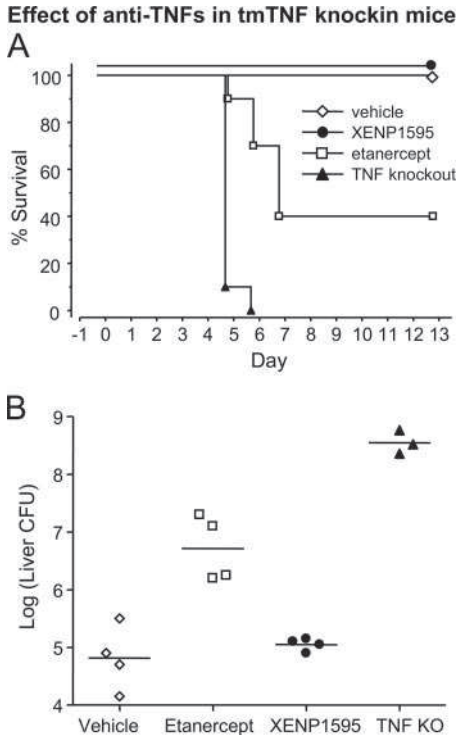



**FIGURE 9.** DN-TNF does not increase mortality of tmTNF knockin mice after *Listeria* challenge. The tmTNF knockin mice ($n = 10$/group) were treated with vehicle or 10 mg/kg XENP1595 or etanercept s.c. on days −1, 2, 6, 9, and 13 and infected with $10^4$ *L. monocytogenes* i.v. on day 0. Survival (*A*) was monitored over 13 days, and bacterial load in the liver (*B*) was measured at day 4 in a satellite group of four mice. *Listeria*-infected TNF knockout mice ($n = 10$) were used as a genetic control for the survival study. In *A*, survival in etanercept and TNF knockout groups is significantly reduced relative to vehicle and XENP1595 groups ($p < 0.005$). In *B*, bacterial load in etanercept and TNF knockout groups is significantly higher than in vehicle and XENP1595 groups ($p < 0.01$). In addition, liver microabscess sizes were significantly increased in the TNF knockout and decoy receptor-treated satellite groups: vehicle, 3.2 ± 1.1 μm; XENP1595, 3.5 ± 0.71 μm; TNF knockout, 46.5 ± 5.7 μm; and etanercept, 38.5 ± 12.2 μm (mean ± SD; $p < 0.01$ for etanercept and TNF knockout compared with vehicle and XENP1595).

## Discussion

These studies show that DN-TNF biologics selectively inhibit solTNF activity in vitro and in vivo. DN-TNFs blocked paracrine

(solTNF) signaling in human and mouse cell lines and in a human whole blood cytokine release assay and were as effective as a nonselective decoy receptor in reducing inflammation in two mouse models of arthritis. In contrast, DN-TNFs failed to block juxtacrine signaling induced by human or mouse tmTNF in the same assays. DN-TNF biologics also maintained innate resistance to *L. monocytogenes* infection in normal and tmTNF knockin mice, while nonselective TNF inhibition by decoy receptor led to a marked immunosuppression and increased mortality.

SolTNF selectivity appears to be an intrinsic property of the dominant-negative mechanism of DN-TNFs. Although the molecular basis for solTNF ligand selectivity remains to be explored, one explanation is that solTNF homotrimers are more labile than tmTNF homotrimers. Trimer dissociation is obligatory for exchange and is likely to be impeded by the large transmembrane and intracellular domains of tmTNF (32, 53) and by the membrane lipid anchor at $Cys^{47}$ (54). The DN-TNF mechanism is not unprecedented in genetics; for example, a recent study describes a mutation in mouse TNF that suppresses TNF activity in vivo by a dominant-negative mechanism (55). However, in this system both solTNF and tmTNF are suppressed because endogenous heterozygotic expression results in the formation of heterotrimeric tmTNF. In contrast to DN-TNFs, anti-TNF Abs and decoy receptor only require TNF binding for activity, explaining the ability of these biologics to inhibit both solTNF and tmTNF.

Ligand selectivity allows DN-TNFs to be used as pharmacologic tools to explore the roles of solTNF and tmTNF in mediating the multiple functions attributed to this cytokine. For example, these are the first data exploiting selective and nonselective pharmacologic inhibitors to demonstrate the minimal contribution of tmTNF to inflammation in mouse arthritis models. Selective inhibition with DN-TNFs was similarly useful in dissecting out the roles of the two forms of TNF in maintaining immunity to infection. Pharmacologic inhibition in *Listeria* challenge models indicates that tmTNF plays a protective role in innate immunity, whereas solTNF appears less important. These results support the hypothesis that tmTNF and solTNF have nonredundant and perhaps complementary roles in inflammation and immunity (2, 7, 10, 19), which was first proposed based on evidence from mouse genetic models. These roles are possibly mediated by differential signaling through TNFR1 and TNFR2 (56–59), potentially coupled with reverse signaling events that can only be induced in cells expressing tmTNF (60). Future studies with DN-TNF biologics may help elucidate the complex signaling events initiated by solTNF and tmTNF ligands acting on TNFR1 and/or TNFR2.

Two reports using tmTNF knockin mice have suggested that tmTNF alone can drive inflammation (61, 62). However, attributing inflammation solely to tmTNF signaling in these mice is problematic, because the two studies report high levels of solTNF expression in homozygous solTNF knockouts. In addition, tmTNF expression in such knockins is abnormally high; such dysregulation of tmTNF levels may lead to nonphysiological in vivo functions. Finally, a complication of genetic models is the lack of temporal control of TNF activity; in unconditional knockouts, TNF is absent throughout development of the immune system, which may lead to compensatory physiological effects. For example, it is known that tmTNF drives normal lymphoid development (7); therefore, genetic models do not allow separation of direct effects on innate immunity of tmTNF from its indirect effects in ensuring normal development of the immune system. This developmental aspect could help explain why some reports indicate that tmTNF knockin mice possess intermediate sensitivity to acute *M. tuberculosis* infection relative to total TNF knockout and $TNF^{+/+}$ mice (13, 14), while other reports suggest that tmTNF knockin mice are as resistant to tuberculosis as $TNF^{+/+}$ mice (16, 52). Another possible explanation for differences between DN-TNF and decoy receptor biologics is the differential inhibition of lymphotoxin $\alpha$ activity by these agents (Fig. 1*E*). Comparative pharmacology studies of the three classes of anti-TNF biologics (decoy receptors, Abs, and dominant negatives) may help explain the signaling differences that underlie their disparate effects on inflammation and immunity, and such studies are in progress.

In conclusion, we have demonstrated that DN-TNF biologics selectively inhibit solTNF activity in vitro and in vivo. TNF ligand selectivity allows these agents to serve as discriminating tools to refine our understanding of the multiple functions of this pleiotropic cytokine and to shed light on the conflicting roles reported for TNF in the immune system and in disease. The use of DN-TNFs in mice, combined with studies in genetic models, suggests that solTNF-selective inhibitors may effectively reduce inflammation while preserving adequate host immunity to infection. Because increased risk of listeriosis and other infections is a liability of nonselective anti-TNF drugs, DN-TNF compounds may have potential for the treatment of rheumatoid arthritis and other inflammatory and autoimmune diseases.

## Acknowledgments

We thank S. O'Neill and V. Lowe of Washington Biotechnology for performing mouse infection and CIA studies, and E. Moradian and A. Moradian of MD Biosciences for performing mouse CAIA studies. We thank Marie Ary for assistance in manuscript preparation.

## Disclosures

The authors affiliated with Xencor have financial interests in Xencor, including employment and stock options.

## References

1. Aggarwal, B. B., A. Samanta, and M. Feldmann. 2000. TNF-$\alpha$. In *Cytokine Reference.* J. J. Oppenheim, and M. Feldmann, eds. Academic Press, London, pp. 413–434.
2. Kollias, G., and D. Kontoyiannis. 2002. Role of TNF/TNFR in autoimmunity: specific TNF receptor blockade may be advantageous to anti-TNF treatments. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13: 315–321.
3. Botha, T., and B. Ryffel. 2003. Reactivation of latent tuberculosis infection in TNF-deficient mice. *J. Immunol.* 171: 3110–3118.
4. Arnett, H. A., Y. Wang, G. K. Matsushima, K. Suzuki, and J. P. Ting. 2003. Functional genomic analysis of remyelination reveals importance of inflammation in oligodendrocyte regeneration. *J. Neurosci.* 23: 9824–9832.
5. Pikarsky, E., R. M. Porat, I. Stein, R. Abramovitch, S. Amit, S. Kasem, E. Gutkovich-Pyest, S. Urieli-Shoval, E. Galun, and Y. Ben-Neriah. 2004. NF-$\kappa$B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 431: 461–466.
6. Holtmann, M. H., and M. F. Neurath. 2004. Differential TNF-signaling in chronic inflammatory disorders. *Curr. Mol. Med.* 4: 439–444.
7. Ruuls, S. R., R. M. Hoek, V. N. Ngo, T. McNeil, L. A. Lucian, M. J. Janatpour, H. Korner, H. Scheerens, E. M. Hessel, J. G. Cyster, et al. 2001. Membrane-bound TNF supports secondary lymphoid organ structure but is subservient to secreted TNF in driving autoimmune inflammation. *Immunity* 15: 533–543.
8. Canault, M., F. Peiretti, C. Mueller, F. Kopp, P. Morange, S. Rihs, H. Portugal, I. Juhan-Vague, and G. Nalbone. 2004. Exclusive expression of transmembrane TNF-$\alpha$ in mice reduces the inflammatory response in early lipid lesions of aortic sinus. *Atherosclerosis* 172: 211–218.
9. Mueller, C., N. Corazza, S. Trachsel-Loseth, H. P. Eugster, M. Buhler-Jungo, T. Brunner, and M. A. Imboden. 1999. Noncleavable transmembrane mouse tumor necrosis factor-$\alpha$ (TNF$\alpha$) mediates effects distinct from those of wild-type TNF$\alpha$ in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 274: 38112–38118.
10. Alexopoulou, L., K. Kranidioti, S. Xanthoulea, M. Denis, A. Kotanidou, E. Douni, P. J. Blackshear, D. L. Kontoyiannis, and G. Kollias. 2006. Transmembrane TNF protects mutant mice against intracellular bacterial infections, chronic inflammation and autoimmunity. *Eur. J. Immunol.* 36: 2768–2780.
11. Pasparakis, M., L. Alexopoulou, V. Episkopou, and G. Kollias. 1996. Immune and inflammatory responses in TNF$\alpha$-deficient mice: a critical requirement for TNF$\alpha$ in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J. Exp. Med.* 184: 1397–1411.
12. Torres, D., L. Janot, V. F. Quesniaux, S. I. Grivennikov, I. Maillet, J. D. Sedgwick, B. Ryffel, and F. Erard. 2005. Membrane tumor necrosis factor confers partial protection to *Listeria* infection. *Am. J. Pathol.* 167: 1677–1687.

13. Olleros, M. L., R. Guler, D. Vesin, R. Parapanov, G. Marchal, E. Martinez-Soria, N. Corazza, J. C. Pache, C. Mueller, and I. Garcia. 2005. Contribution of transmembrane tumor necrosis factor to host defense against *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-guerin and *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Am. J. Pathol.* 166: 1109–1120.
14. Saunders, B. M., S. Tran, S. Ruuls, J. D. Sedgwick, H. Briscoe, and W. J. Britton. 2005. Transmembrane TNF is sufficient to initiate cell migration and granuloma formation and provide acute, but not long-term, control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.* 174: 4852–4859.
15. Fremond, C., N. Allie, I. Dambuza, S. I. Grivennikov, V. Yeremeev, V. F. Quesniaux, M. Jacobs, and B. Ryffel. 2005. Membrane TNF confers protection to acute mycobacterial infection. *Respir. Res.* 6: 136.
16. Jacobs, M., A. Samarina, S. Grivennikov, T. Botha, N. Allie, C. Fremond, D. Togbe, V. Vasseur, S. Rose, F. Erard, et al. 2007. Review: reactivation of tuberculosis by tumor necrosis factor neutralization. *Eur. Cytokine Network* 18: 1–9.
17. Jacob, C. O. 1992. Tumor necrosis factor $\alpha$ in autoimmunity: pretty girl or old witch? *Immunol. Today* 13: 122–125.
18. Saha, R. N., and K. Pahan. 2003. Tumor necrosis factor-$\alpha$ at the crossroads of neuronal life and death during HIV-associated dementia. *J. Neurochem.* 86: 1057–1071.
19. Grivennikov, S. I., A. V. Tumanov, D. J. Liepinsh, A. A. Kruglov, B. I. Marakusha, A. N. Shakhov, T. Murakami, L. N. Drutskaya, I. Forster, B. E. Clausen, et al. 2005. Distinct and nonredundant in vivo functions of TNF produced by T cells and macrophages/neutrophils; protective and deleterious effects. *Immunity* 22: 93–104.
20. Scheinfeld, N. 2004. A comprehensive review and evaluation of the side effects of the tumor necrosis factor $\alpha$ blockers etanercept, infliximab and adalimumab. *J. Dermatolog. Treat.* 15: 280–294.
21. Slifman, N. R., S. K. Gershon, J. H. Lee, E. T. Edwards, and M. M. Braun. 2003. *Listeria monocytogenes* infection as a complication of treatment with tumor necrosis factor $\alpha$-neutralizing agents. *Arthritis Rheum.* 48: 319–324.
22. Wallis, R. S., M. S. Broder, J. Y. Wong, M. E. Hanson, and D. O. Beenhouwer. 2004. Granulomatous infectious diseases associated with tumor necrosis factor antagonists. *Clin. Infect. Dis.* 38: 1261–1265.
23. Wallis, R. S., M. Broder, J. Wong, and D. Beenhouwer. 2004. Granulomatous infections due to tumor necrosis factor blockade: correction. *Clin. Infect. Dis.* 39: 1254–1255.
24. Bongartz, T., A. J. Sutton, M. J. Sweeting, I. Buchan, E. L. Matteson, and V. Montori. 2006. Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. *J. Am. Med. Assoc.* 295: 2275–2285.
25. Agnholt, J., J. F. Dahlerup, and K. Kaltoft. 2003. The effect of etanercept and infliximab on the production of tumour necrosis factor $\alpha$, interferon-$\gamma$ and GM-CSF in in vivo activated intestinal T lymphocyte cultures. *Cytokine* 23: 76–85.
26. Scallon, B., A. Cai, N. Solowski, A. Rosenberg, X. Y. Song, D. Shealy, and C. Wagner. 2002. Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301: 418–426.
27. Shen, C., G. V. Assche, S. Colpaert, P. Maerten, K. Geboes, P. Rutgeerts, and J. L. Ceuppens. 2005. Adalimumab induces apoptosis of human monocytes: a comparative study with infliximab and etanercept. *Aliment Pharmacol. Ther.* 21: 251–258.
28. Mitoma, H., T. Horiuchi, N. Hatta, H. Tsukamoto, S. Harashima, Y. Kikuchi, J. Otsuka, S. Okamura, S. Fujita, and M. Harada. 2005. Infliximab induces potent anti-inflammatory responses by outside-to-inside signals through transmembrane TNF-$\alpha$. *Gastroenterology* 128: 376–392.
29. Steed, P. M., M. G. Tansey, J. Zalevsky, E. A. Zhukovsky, J. R. Desjarlais, D. E. Szymkowski, C. Abbott, D. Carmichael, C. Chan, L. Cherry, et al. 2003. Inactivation of TNF signaling by rationally designed dominant-negative TNF variants. *Science* 301: 1895–1898.
30. McCoy, M. K., T. N. Martinez, K. A. Ruhn, D. E. Szymkowski, C. G. Smith, B. R. Botterman, K. E. Tansey, and M. G. Tansey. 2006. Blocking soluble tumor necrosis factor signaling with dominant-negative tumor necrosis factor inhibitor attenuates loss of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 26: 9365–9375.
31. Hug, H., M. Los, W. Hirt, and K. M. Debatin. 1999. Rhodamine 110-linked amino acids and peptides as substrates to measure caspase activity upon apoptosis induction in intact cells. *Biochemistry* 38: 13906–13911.
32. Perez, C., I. Albert, K. DeFay, N. Zachariades, L. Gooding, and M. Kriegler. 1990. A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell* 63: 251–258.
33. Torres, D., M. Barrier, F. Bihl, V. J. Quesniaux, I. Maillet, S. Akira, B. Ryffel, and F. Erard. 2004. Toll-like receptor 2 is required for optimal control of *Listeria monocytogenes* infection. *Infect. Immun.* 72: 2131–2139.
34. Loetscher, H., D. Stueber, D. Banner, F. Mackay, and W. Lesslauer. 1993. Human tumor necrosis factor $\alpha$ (TNF$\alpha$) mutants with exclusive specificity for the 55-kDa or 75-kDa TNF receptors. *J. Biol. Chem.* 268: 26350–26357.
35. Fujita, E., T. Mukasa, T. Tsukahara, K. Arahata, S. Omura, and T. Momoi. 1996. Enhancement of CPP32-like activity in the TNF-treated U937 cells by the proteasome inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224: 74–79.
36. Varghese, J., S. Chattopadhaya, and A. Sarin. 2001. Inhibition of p38 kinase reveals a TNF-$\alpha$-mediated, caspase-dependent, apoptotic death pathway in a human myelomonocyte cell line. *J. Immunol.* 166: 6570–6577.
37. Hohmann, H. P., R. Remy, M. Brockhaus, and A. P. van Loon. 1989. Two different cell types have different major receptors for human tumor necrosis factor (TNF $\alpha$). *J. Biol. Chem.* 264: 14927–14934.
38. Wright, S. C., P. Kumar, A. W. Tam, N. Shen, M. Varma, and J. W. Larrick. 1992. Apoptosis and DNA fragmentation precede TNF-induced cytolysis in U937 cells. *J. Cell. Biochem.* 48: 344–355.
39. Faraco, P. R., E. C. Ledgerwood, P. Vandenabeele, J. B. Prins, and J. R. Bradley. 1999. Tumor necrosis factor induces distinct patterns of caspase activation in WEHI-164 cells associated with apoptosis or necrosis depending on cell cycle stage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261: 385–392.
40. Khabar, K. S., S. Siddiqui, and J. A. Armstrong. 1995. WEHI-13VAR: a stable and sensitive variant of WEHI 164 clone 13 fibrosarcoma for tumor necrosis factor bioassay. *Immunol. Lett.* 46: 107–110.
41. Ameloot, P., W. Declercq, W. Fiers, P. Vandenabeele, and P. Brouckaert. 2001. Heterotrimers formed by tumor necrosis factors of different species or muteins. *J. Biol. Chem.* 276: 27098–27103.
42. Decoster, E., B. Vanhaesebroeck, P. Vandenabeele, J. Grooten, and W. Fiers. 1995. Generation and biological characterization of membrane-bound, uncleavable murine tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.* 270: 18473–18478.
43. Fiorucci, S., E. Antonelli, G. Migliorati, L. Santucci, O. Morelli, B. Federici, and A. Morelli. 1998. TNF$\alpha$ processing enzyme inhibitors prevent aspirin-induced TNF$\alpha$ release and protect against gastric mucosal injury in rats. *Aliment Pharmacol. Ther.* 12: 1139–1153.
44. Frishman, J. I., C. K. Edwards III, M. G. Sonnenberg, T. Kohno, A. M. Cohen, and C. A. Dinarello. 2000. Tumor necrosis factor (TNF)-$\alpha$-induced interleukin-8 in human blood cultures discriminates neutralization by the p55 and p75 TNF soluble receptors. *J. Infect. Dis.* 182: 1722–1730.
45. DeForge, L. E., J. S. Kenney, M. L. Jones, J. S. Warren, and D. G. Remick. 1992. Biphasic production of IL-8 in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human whole blood: separation of LPS- and cytokine-stimulated components using anti-tumor necrosis factor and anti-IL-1 antibodies. *J. Immunol.* 148: 2133–2141.
46. Terato, K., K. A. Hasty, R. A. Reife, M. A. Cremer, A. H. Kang, and J. M. Stuart. 1992. Induction of arthritis with monoclonal antibodies to collagen. *J. Immunol.* 148: 2103–2108.
47. Nandakumar, K. S., and R. Holmdahl. 2005. Efficient promotion of collagen antibody induced arthritis (CAIA) using four monoclonal antibodies specific for the major epitopes recognized in both collagen induced arthritis and rheumatoid arthritis. *J. Immunol. Methods* 304: 126–136.
48. Kagari, T., H. Doi, and T. Shimozato. 2002. The importance of IL-1$\beta$ and TNF-$\alpha$, and the noninvolvement of IL-6, in the development of monoclonal antibody-induced arthritis. *J. Immunol.* 169: 1459–1466.
49. Joosten, L. A., M. M. Helsen, F. A. van de Loo, and W. B. van den Berg. 1996. Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. A comparative study using anti-TNF$\alpha$, anti-IL-1$\alpha$/$\beta$, and IL-1Ra. *Arthritis Rheum.* 39: 797–809.
50. Wooley, P. H., J. Dutcher, M. B. Widmer, and S. Gillis. 1993. Influence of a recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor FC fusion protein on type II collagen-induced arthritis in mice. *J. Immunol.* 151: 6602–6607.
51. Coppieters, K., T. Dreier, K. Silence, H. de Haard, M. Lauwereys, P. Casteels, E. Beirnaert, H. Jonckheere, C. Van de Wiele, L. Staelens, et al. 2006. Formatted anti-tumor necrosis factor $\alpha$ VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 54: 1856–1866.
52. Jacobs, M., D. Togbe, C. Fremond, A. Samarina, N. Allie, T. Botha, D. Carlos, S. K. Parida, S. Grivennikov, S. Nedospasov, et al. 2007. Tumor necrosis factor is critical to control tuberculosis infection. *Microbes Infect.* 9: 623–628.
53. Pennica, D., G. E. Nedwin, J. S. Hayflick, P. H. Seeburg, R. Derynck, M. A. Palladino, W. J. Kohr, B. B. Aggarwal, and D. V. Goeddel. 1984. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312: 724–729.
54. Utsumi, T., T. Takeshige, K. Tanaka, K. Takami, Y. Kira, J. Klostergaard, and R. Ishisaka. 2001. Transmembrane TNF (pro-TNF) is palmitoylated. *FEBS Lett.* 500: 1–6.
55. Rutschmann, S., K. Hoebe, J. Zalevsky, X. Du, N. Mann, B. I. Dahiyat, P. Steed, and B. Beutler. 2006. PanR1, a dominant negative missense allele of the gene encoding TNF-$\alpha$ (Tnf), does not impair lymphoid development. *J. Immunol.* 176: 7525–7532.
56. Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich. 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 10: 45–65.
57. Grell, M. 1995. Tumor necrosis factor (TNF) receptors in cellular signaling of soluble and membrane-expressed TNF. *J. Inflamm.* 47: 8–17.
58. Grell, M., H. Wajant, G. Zimmermann, and P. Scheurich. 1998. The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 570–575.
59. Grell, M., E. Douni, H. Wajant, M. Lohden, M. Clauss, B. Maxeiner, S. Georgopoulos, W. Lesslauer, G. Kollias, K. Pfizenmaier, and P. Scheurich. 1995. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83: 793–802.
60. Eissner, G., W. Kolch, and P. Scheurich. 2004. Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15: 353–366.
61. Edwards, C. K., III, A. M. Bendele, L. I. Reznikov, G. Fantuzzi, E. S. Chlipala, L. Li, L. L. Moldawer, J. D. Mountz, Y. Y. Li, and C. A. Dinarello. 2006. Soluble human p55 and p75 tumor necrosis factor receptors reverse spontaneous arthritis in transgenic mice expressing transmembrane tumor necrosis factor $\alpha$. *Arthritis Rheum.* 54: 2872–2885.
62. Alexopoulou, L., M. Pasparakis, and G. Kollias. 1997. A murine transmembrane tumor necrosis factor (TNF) transgene induces arthritis by cooperative p55/p75 TNF receptor signaling. *Eur. J. Immunol.* 27: 2588–2592.

# Chapitre 2 : Etude du rôle des TLR5, TLR4 et du co-récepteur CD14 dans l'inflammation pulmonaire induite par la flagelline

---

**Article 4:** Radioresistant cells expressing toll-like receptor 5 control the respiratory epithelium's innate immune responses to flagellin (en 2ème revue à European Journal of Immunology)

Laure Janot, Jean-Claude Sirard, Thomas Secher, Nicolas Noulin, Lizette Fick, Shizuo Akira, Satoshi Uematsu, Arnaud Didierlaurent, Tracy Hussell, Bernhard Ryffel, François Erard

---

La muqueuse plumonaire joue un rôle important dans l'initiation de l'immunité innée. En effet, sa large surface l'expose sans cesse aux particules environnementales comme les poussières, les métaux ou les bactéries. L'organisme met en œuvre différents dispositifs lui permettant de garder stérile le tractus respiratoire. La barrière épithéliale constitue une barrière physique importante contre les antigènes. Certaines bactéries flagellées comme *Pseudomonas aeruginasa* ou *Legionella pneumophila* franchissent tout de même cette barrière et leur détection par les TLR déclenche la réponse immunitaire innée (342, 395).

Nous avons employé la flagelline issue de *Salmonella typhimurium* afin d'étudier la réponse immunitaire pulmonaire après son administration par voie nasale. Certains travaux ont montré la formation de l'hétérodimère TLR5/TLR4 après stimulation par flagelline. Nous avons voulu vérifier cette possible association en utilisant les souris déficientes pour TLR4 ou TLR5. De plus, le co-récepteur CD14 peut intervenir dans la détection des pathogènes afin d'aider la réponse des TLR2, TLR4 et TLR3 (132, 140, 141). Nous avons donc exploré la piste d'une détection de la flagelline par CD14. Par ailleurs, la construction de souris chimériques nous a permis d'étudier la contribution des cellules épithéliales radiorésistantes ainsi que celle des cellules myéloides radiosensitives dans l'inflammation par la flagelline.

L'administration de la flagelline provoque, au même titre que le LPS, une difficulté respiratoire mesurée par pléthysmographie non invasive. Il se produit une

constriction des voies respiratoires que nous traduisons par le temps de pause respiratoire, ou PenH. Ainsi, contrairement aux souris TLR5-/- et MyD88-/-, les animaux sauvages C57BL /6, TLR4-/-, Trif-/- et CD14-/- sont en détresse respiratoire. L'analyse des cellules présentes dans leur lavage bronchoalvéolaire et l'étude histologique 24h après l'instillation indiquent que cette constriction est accompagnée d'une migration des neutrophiles dans le tissu pulmonaire. Nous avons pu déterminer que ni le CD14, ni TLR4 et l'adaptateur Trif ne participent à la détection de la flagelline ni à sa signalisation.

De plus, l'instillation de flagelline aux souris chimériques nous a permis d'établir que cellules résidentes et cellules myéloides ont des rôles disctincts dans la réponse à la flagelline. Il semble que les cellules radiorésistantes composées essentiellement de cellules épithéliales mais aussi endothéliales, sont responsables du recrutement des neutrophiles dans le tissu pulmonaire ainsi que de la production d'IL-6 et des chimiokines comme CXCL1 et CXCL5. La sécrétion de TNF ne dépend que de la réponse des cellules myéloides.

# Radioresistant cells expressing toll-like receptor 5 control the respiratory epithelium's innate immune responses to flagellin

| | |
|---|---|
| Journal: | *European Journal of Immunology - 2* |
| Manuscript ID: | EJI-2008-38907.R2 |
| Wiley - Manuscript type: | Regular Article |
| Date Submitted by the Author: | 20-Mar-2009 |
| Complete List of Authors: | JANOT, Laure; CNRS Orleans, UMR 6218<br>Sirard, Jean-Claude; INSERM, Institut Pasteur Lille<br>Secher, Thomas; CNRS, Molecular Immunology and Embriology UMR6218<br>Noulin, Nicolas; CNRS, Molecular Immunology and Embriology UMR6218<br>Fick, Lysette; Institute of Immunology and Infectious Desease and molecular Medicine<br>Akira, Shizuo; Osaka University, Department of Host Defense<br>Uematsu, Satoshi; Osaka University, Department of Host Defense<br>Didierlaurent, Arnaud; Glaxosmithkline Biologicals<br>Hussell, Tracy; Imperial College London, National Heart and Lung Institute<br>Ryffel, Bernhard; CNRS, Molecular Immunology and Embriology UMR6218<br>Erard, François; CNRS, Molecular Immunology and Embriology UMR6218 |
| Keywords: | Flagellin, Lung inflammation, TLR5, epithelium, chemokine |
| | |

# Radioresistant cells expressing toll-like receptor 5 control the respiratory epithelium's innate immune responses to flagellin

Laure Janot[1*], Jean-Claude Sirard[2*], Thomas Secher[1], Nicolas Noulin[1], Lizette Fick[3], Shizuo Akira[4], Satoshi Uematsu[4], Arnaud Didierlaurent[5,6], Tracy Hussell[5], Bernhard Ryffel[1], François Erard[1]

[1]University of Orleans and CNRS Molecular Immunology and Embryology UMR 6218, Institut de Transgénose, Orléans, France; [2]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U801; Institut Pasteur de Lille; Université de Lille 2; Institut Fédératif de Recherche 142; Equipe d'Immunité Anti-Microbienne des Muqueuses, Lille, France ; [3]Institute of Immunology and Infectious Desease and Molecular Medicine, University of Cape town, Cap Town RSA ; [4]Department of Host Defense, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University ; [5]Kennedy Institute of Rheumatology, Faculty of Medicine, Imperial College of London, W68LH, UK. [6]Present address: Glaxosmithkline Biologicals, Rixensart, Belgium

* LJ and JCS contributed equally to the work

Running title: TLR5-dependent lung inflammatory response

Address for correspondence: Bernhard Ryffel, University of Orleans and CNRS, UMR6218, Molecular Immunology and Embryology, 45071 Orleans cedex 2, France. Email: bryffel@cnrs-orleans.fr

Keywords: Flagellin, TLR5, lung inflammation, epithelium, chemokine

Acknowledgements: This work was supported by the CNRS, a fellowship from the French Ministry of Education to L.J., the European Community (STREP SavinMucoPath INCO-CT-2006-032296) and the Région Nord Pas de Calais (ARCir Europe) to J.C.S, and the UK Medical Research Council to A.D. and T.H.

Conflict of interest: the authors declare no financial or commercial conflicts of interest.

For Peer Review

## Abstract

Bacterial products (such as endotoxins and flagellin) trigger innate immune responses through toll-like receptors (TLRs). Flagellin-induced signalling involves TLR5 and MyD88 and, according to some reports, TLR4. Whereas epithelial and dendritic cells are stimulated by flagellin *in vitro*, the cells' contribution to the *in vivo* response is still unclear. Here, we studied the respective roles of radioresistant and radiosensitive cells in flagellin-induced airway inflammation in mice. We found that intranasal delivery of flagellin elicits a transient change in respiratory function and an acute, pro-inflammatory response in the lungs, characterized by TLR5- and MyD88-dependent chemokine secretion and neutrophil recruitment. In contrast, TLR4, CD14 and TRIF were not essential for flagellin-mediated responses, indicating that TLR4 does not cooperate with TLR5 in the lungs. Respiratory function, chemokine secretion and airway infiltration by neutrophils were dependent on radioresistant, TLR5-expressing cells. Furthermore, lung haematopoietic cells also responded to flagellin by activating TNFα production. We suggest that the radioresistant lung epithelial cells are essential for initiating early, TLR5-dependent signalling in response to flagellin and thus triggering the lung's innate immune responses.


For Peer Review

## *Introduction*

Upon challenge with respiratory pathogens, the airways rapidly develop a pro-inflammatory response initiated by environmental agents including microbe-associated molecular patterns (MAMP) such as Gram-negative bacteria lipopolysaccharides (LPS or endotoxins). This pro-inflammatory reaction plays an important role in the innate defence against respiratory pathogens [1, 2]. Physiological changes induced by endotoxin inhalation include pulmonary function and bronchoconstriction`, cytokine and chemokine production`, polymorphonuclear neutrophil (PMN) recruitment`, increased permeability of the alveolar epithelium and the associated endothelium [3-6]. Toll-like receptor (TLR) 4 [7], together with MD-2, LPS-binding protein (LBP) and CD14 detect endotoxins and play a critical role in the initiation of the pulmonary response to systemic and mucosal endotoxin administration [5, 8-10]. The pulmonary inflammation to endotoxin involves TLR4 signalling in both the parenchyma cells like endothelial and epithelial cells and the haematopoietic cells, i.e. monocytes, dendritic cells and neutrophils [11]. In addition, TLR4 signalling contributes to the development and progression of chronic respiratory disease including asthma [12-16].

Flagellin is the major constituent of flagella from Gram-negative and Gram-positive bacteria. TLR5 has been identified as the main pattern recognition receptor required for flagellin-mediated immune signalling [17]. TLR5 signalling depends on MyD88 and results in activation of MAPKs, nuclear translocation of NF-κB and production of various proinflammatory cytokines and chemokines [18]. Moreover, a previous report found that TLR5 cooperates with TLR4, suggesting that TLR4 deficiency will affect flagellin-mediated responses [19]. A common stop codon polymorphism in TLR5 is associated to both increased susceptibility to pneumonia caused by the flagellated bacteria *Legionella pneumophila* and resistance to Crohn's disease, indicating that TLR5 signalling is relevant for mucosal immunity [20, 21]. With TLR5-deficient mice, the critical role of TLR5 in mucosal inflammatory responses was established since deletion of *Tlr5* gene alters response to respiratory, intestinal and urinary tract infections as well as mucosal homeostasis [1, 22-26]. Parenchyma and haematopoietic cells play a different role in TLR5-dependent mucosal immunity depending on the tissue studied. In the gut, dendritic cells of the lamina propria, i.e. haematopoietic cells, have been shown to be instrumental in TLR5 signalling [23]. Using chimeric mice with wild type (WT) or *Tlr5* -/- bone marrow (BM), Feuillet *et al* observed that TNFα and IL-6 production in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) after flagellin administration is dependent on haematopoietic and radioresistant cells while lung



For Peer Review

neutrophil infiltration mainly required TLR5 competent non-haematopoietic cells [22]. More recently, TNFα production in flagellin-stimulated lung was found to be associated with alveolar macrophages [27].

Here we further investigated the compartmentalization of flagellin-dependent pro-inflammatory responses in the lung. As expected, we found that the response is characterized by lung infiltration by neutrophils, transient local cytokine and chemokine expression. In addition, we showed that flagellin induces alteration of ventilation, a hallmark of respiratory function. We reported that flagellin-mediated activation is abrogated in TLR5- and MyD88-deficient mice but not in TLR4-deficient animals, indicating the sole contribution of TLR5 in flagellin-mediated immunity. Using BM chimeras, we further show that radioresistant cells expressing TLR5, most likely epithelial cells, control respiratory function, chemokine secretion and neutrophil infiltration. Finally, we confirmed that haematopoietic cells, likely alveolar and lung macrophages mediate TNFα production.

For Peer Review

Results

***Flagellin-induced bronchoconstriction is TLR5-dependent***

Since airway exposure to LPS alters ventilatory timing suggesting increase in airway resistance and bronchial responsiveness [11], we assessed whether flagellin, the TLR5 agonist, triggers such a response and whether various TLRs and adaptors contribute to the response. Flagellin was instilled i.n. into mice and the ventilation (PenH) was measured by whole body plethysmography. In wild type (WT) mice, flagellin elicited a rapid PenH increase within 90min, reaching a maximum at 120min and decreasing towards basal level after 4h, while TLR5-deficient mice were unresponsive (Fig. 1A). Trypsin-hydrolysed flagellin did not cause any change in respiratory function, confirming the specificity of the flagellin/TLR5 mediated response. A recent report suggested that TLR5 cooperates with TLR4 [19]. Flagellin-induced airway response was found to be MyD88-dependent, but TRIF-independent (Fig. 1B). We also found that ventilatory function was TLR4- and CD14-independent supporting that the flagellin-induced airway hyperreactivity depends solely on TLR5 signalling (data not shown). Therefore, flagellin promotes the increase of airway resistance and reactivity in a TLR5- and MyD88-dependent manner.

***Flagellin-mediated lung PMN infiltration depends on TLR5 signalling***

We then investigated whether the alterations of ventilation in response to flagellin in TLR5-deficient mice was associated with effects on lung innate responses as described by Feuillet *et al.* [22]. First, we analysed the total inflammatory cells, PMN and macrophages recruited to the bronchoalveolar space after flagellin administration. While abundant inflammatory cells recruitment was observed after flagellin administration in the BALF of WT animals *or Tlr4-/-, Cd14-/-* and *Trif-/-* animals, it was absent in *Tlr5-/-* and *MyD88-/-* mice (Fig. 2A-B). Neutrophil infiltration was also characterized in the lung parenchyma by measuring myeloperoxidase (MPO) activity in tissue homogenates. While WT mice showed elevated MPO activity 3h after flagellin administration, *Tlr5-/-* and *Myd88-/-* mice did not display any increased activity similar to saline-treated controls (Fig. 2C and data not shown). In *Tlr4-/-, Cd14-/-* and *Trif-/-*, flagellin promoted MPO increase similarly to WT mice (Fig. 2C). The PMN recruitment was not merely delayed in *Tlr5-/-* and *Myd88-/-* mice as MPO activity did not increase at 24h



For Peer Review

and 72h (data not shown). Finally, we performed semi-quantitative histological analysis to determine any alterations in the PMN localization in deficient animals (Fig. 3). Tissue sections of flagellin-activated lung showed neutrophil infiltrates in the interstitial and alveolar spaces. The infiltrate was not seen using with trypsin-hydrolysed flagellin (Fig. 3A) and completely absent in flagellin-treated *Tlr5-/-* and *Myd88-/-* mice (data not shown). We confirmed these observations by scoring the infiltration as described in Materials and Methods (Fig. 3B). Therefore, flagellin-mediated transendothelial and transepithelial PMN infiltration into lung parenchyma and bronchoalveolar spaces is TLR5- and MyD88 dependent.

***Flagellin response in the lungs mainly depends on TLR5-expressing radioresistant cells***

We next examined the respective role of haematopoietic versus stromal/parenchymal cells in the flagellin-induced airway response. For this purpose, we irradiated recipient mice to deplete radiosensitive haematopoietic cells and generated chimera by injection of donor bone marrow (BM) as previously described [28, 29]. Thus, after reconstitution, the lung radioresistant stromal/parenchymal cells were from recipient origin and haematopoietic cells from donor origin.

With respect to ventilatory function, WT animals reconstituted with *Tlr5-/-* (KO) BM (KO→WT) had responses similar to WT animals (Figs. 1A and 4A). Conversely, reconstitution of *Tlr5-/-* mice with WT BM (WT→KO) did not result in any increase of PenH in response to flagellin as observed with TLR5-deficient mice (Figs. 1A and 4A). Therefore, these data show that the alteration of ventilatory function induced by flagellin is essentially due to radioresistant lung cells. Regarding PMN infiltration, KO→WT animals showed a neutrophil influx in BALF similar to the WT control (Fig. 4B). Conversely, WT→KO reconstitution only partially stimulated neutrophil recruitment into the BALF in response to flagellin compared to KO→KO (Fig. 4B). In addition, KO→WT chimera displayed significant levels of MPO activity compared to WT→KO and KO→KO mice where MPO was hardly detected in lung homogenates (Fig.4C). However, we observed a reduced MPO increase in KO→WT compared to controls WT→WT. Histological analyses confirmed the critical role of radioresistant resident cells expressing TLR5 in the PMN recruitment (data not shown). Altogether, these data showed that neutrophil emigration from blood into the lung tissue and alveoli in response to flagellin instillation essentially depends on radioresistant resident cells expressing TLR5. These cells are likely bronchial and/or alveolar epithelial cells since they are known to produce TLR5 and respond in



For Peer Review

vitro to flagellin by secreting neutrophil-specific chemoattractants like the chemokines CXCL1, CXCL5 and CXL8 [20 , 27, 30 , 31 , 32 ]. Alternatively, the flagellin-responsive radioresitant cells may be smooth muscle or endothelial cells of the respiratory tract.

We next investigated the contribution of radioresistant cells to the cytokine and chemokine produced in lung homogenates from chimeric mice. We first focused on the chemokines CXCL1 and CXCL5 that are potent PMN chemoattractants. Similar to KO→KO, WT→KO mice produced low levels of CXCL1 within BALF in response to flagellin while WT mice reconstituted with either WT or KO cells produced high levels of CXCL1 (Fig. 5A). Transcription of *Cxcl5* gene in lung tissue was poorly activated in WT→KO animals like KO→KO control, upon flagellin administration (Fig. 6A). In contrast, KO→WT like WT→WT mice had increased levels of *Cxcl5* mRNA in lungs after flagellin stimulation. These data suggest that the radioresistant resident cells are predominantly responsible for the expression of chemokine genes favouring PMN recruitment in response to flagellin. *Cxcl1* transcription in the lung tissue was upregulated by flagellin treatment in WT→WT but essentially unchanged in KO→KO mice. Interestingly, *Cxcl1* transcription in the whole lung was dependent on both radioresistant resident cells and haematopoietic cells since KO→WT and WT→KO chimera presented comparable increases in *Cxcl1* mRNA levels (Fig.5A). The discrepancies between CXCL1 protein in BALF and lung *Cxcl1* mRNA may reflect differences in the kinetics and peak of expression between the radioresistant and radiosensitive cells or differentially polarized secretion (luminal for radioresistant cells and eventually basal for radiosensitive cells). However, the results support the idea that the chemokines produced by radioresistant compartment are instrumental for PMN recruitment.

A differential role of parenchymal radioresistant and myeloid cells was found for the expression of the pleiotropic mediators TNFα and IL-6 (Figs. 5 and 6). Analysis of TNFα expression by ELISA and intracellular staining as well as *Tnf* mRNA synthesis showed that WT→KO chimera recapitulated expression of TNFα as WT→WT control and, conversely, that KO→WT and KO→KO mice had no flagellin-dependent TNFα expression (Figs. 5B-D and 6C). Therefore, flagellin-induced TNFα production in lung tissue was clearly dependent on the haematopoietic cells. We also determined that CD11b- Ly6G- parenchymal cells, CD11b+ Ly6G-, CD11b+ Ly6G+ cells were respectively the main producers of TNFα (56%, 22% and 23%). In contrast, IL-6 was produced in BALF when TLR5 is expressed on radioresistant cells

For Peer Review

(Fig. 5C). However, *Il6* transcription in the lung was variably activated by flagellin both in parenchymal or bone marrow-derived cells that express TLR5 (Fig. 6D).

Finally, TLR5 expression was analyzed by real time qPCR on radioresistant and radiosensitive lung cells, respectively, alveolar epithelial cells and alveolar macrophages as described previously [27]. We found that the relative levels of *Tlr5* mRNA were respectively 0.7310 ± 0.1384 (n=8) and 2.240 ± 0.2402 (n=7), indicating that these two cell types express significant levels of TLR5 and are both competent for TLR5 signalling. This observation supports the compartmentalized effect of TLR5 on both radioresistant and radiosensitive.

Our results suggest that, on the one hand, radioresistant lung epithelial cells are involved in the initiation of inflammatory response by the production of IL-6, but also of chemokines (CXCL1 and CXCL5), which are important for neutrophils recruitment to the lung. On the other hand, we show that TLR5 positive bone-marrow derived-cells are responsible for TNFα secretion.

For Peer Review

***Discussion***

Mucosal tissues are compartmentalized into three regions: the lumen (the external environment), the epithelial barrier and the parenchyma (the lamina propria). How compartmentalization controls mucosal innate immunity is not well understood and needs to be further investigated in order to develop appropriate therapeutic and prophylactic measures. In the mucosa, toll-like receptors (TLRs) induce early signalling dedicated to protective innate immune responses against microorganisms. Here, we studied the respective roles of resident radioresistant and radiosensitive haematopoietic cells in the airway's TLR5-mediated pro-inflammatory response to flagellin in mice. We showed that the airway resistance, chemokine secretion and airway infiltration by neutrophils in response to flagellin depend mainly on the responsiveness of radioresistant lung cells.

In the mucosa, the epithelial cells' prime position at the border between internal and external compartments means that they are the first to encounter pathogens. Hence, in the respiratory tract, bronchial and alveolar epithelial cells with alveolar macrophages are the main sentinels in the detection of microbial signals through innate receptors like the TLRs [33]. A variety of studies have demonstrated that lung and intestinal epithelial cells respond to flagellin by producing PMN-specific chemokines (CXCL1, CXCL5 or CXCL8), cytokines (TNFα and IL-6) and antimicrobial molecules (NO and h-βD2) [18]. These findings agree with TLR5's predominant expression in lung and intestinal epithelial cells; hence, the epithelium is considered to be one of the main TLR5-responsive compartments [34, 35]. Here, we used *Salmonella typhimurium* flagellin and its cognate detector TLR5 as models for investigating the contribution of radioresistant and radiosensitive cells to lung innate immunity. As previously described [22], PMN recruitment was greater in animals in which wild type haematopoietic cells were replaced by *Tlr5-/-* cells (Fig. 4B) - suggesting that *in vivo*, TLR5 signalling in radioresistant (and probably epithelial) cells is prominent in lung responses. Our study further showed a similar dependence for respiratory function and the secretion of the PMN-specific chemokines CXCL1 and CXCL5 (Figs. 4-5). However, discrimination of compartment contributions by *Cxcl1* transcriptional analyses was less clear-cut; this discrepancy between CXCL1 protein and *Cxcl1* transcripts may represent a difference in the kinetics of transcription-translation-secretion, the nature of compartment analyzed (BALF vs lung), a threshold in effective production of gene product and/or polarized secretion of proteins in our experiments. Consequently, our study reinforces the hypothesis whereby the epithelium has a key role in *in vivo* mucosal, pro-inflammatory processes.



For Peer Review

In the literature, there are some divergences on how TLR5 is exposed on epithelial cells [36]. Since TLR5 is active when flagellin is administered intranasally, we assume that apical/luminal signalling induces the epithelial response, as described previously [37]. It has been suggested that this type of epithelial innate mechanism is essential in mucosal defence against *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa* and uropathogenic *Escherichia coli* [22, 26, 38]. Furthermore, respiratory pathogens that reach the basolateral side of the epithelial barrier via specific transport mechanisms or following trauma can stimulate either epithelial cells, airway smooth muscle, endothelial cells or any TLR5-expressing haematopoietic cells (such as lung macrophages and dendritic cells). Notably, the intestine's innate response to flagellin relies on dendritic cell activation [1, 23, 39]. This compartmentalization may control the production of pro-inflammatory responses to signals from the gut's microbial flora.

In lung tissue, both non-haematopoietic radioresistant cells (such as epithelial cells) and haematopoietic radioresistant cells (such as alveolar, lung macrophages and dendritic cells) are instrumental in inducing TLR4-dependent innate responses [11, 40]. Literature studies have shown that LPS-induced changes in airway function and PMN recruitment depend on radioresistant cells, while production of cytokines (such as TNFα or IL-12p40) depends on the TLR4/MyD88 pathway in tissue-resident myeloid cells. Here, we also observed that resident haematopoietic cells participate in TLR5-mediated innate responses to a certain extent, since TNFα production is abolished in WT mice reconstituted with TLR5-deficient bone marrow (Fig. 5B). Following systemic activation, both radiosensitive and radioresistant cells respond to flagellin [41, 42]. Haematopoietic cells are the major source of the pro-inflammatory cytokines TNFα, IL-12 and IL-6, whereas radioresistant cells produce CXCL1, CXCL10 and CCL2. Taken as a whole, these data suggest that radioresistant and radiosensitive cells play distinct roles in the innate response to flagellin in systemic and mucosal models.

In TLR4-mediated lung innate responses, alveolar macrophages are the main LPS target [40]. Interestingly, alveolar macrophages and epithelial cells display similar TLR5 expression levels. Recently, lung macrophages have been identified as the main source of TNFα production following flagellin stimulation [27, 38]. However, the impact of this type of signalling on the host's defence against pathogens remains to be defined. Macrophages have a central role in the maintenance of immunological homeostasis and the host defences. Cross-talk between lung epithelial cells and alveolar macrophages is known to inhibit the latter's inflammatory properties [43, 44]. Although alveolar macrophages are quiescent under steady-state conditions, they can be activated by extrinsic and intrinsic stimuli and then participate in phagocytosis, bacterial killing



For Peer Review

and tissue wound healing [45, 46]. As described above, epithelial cells also sense bacterial products and activate TLR signalling, which essentially promotes PMN-mediated immunity. The matter of how epithelium and macrophages collaborate on local amplification or sequential activation of innate immunity is still under investigation. Recent observations have revealed that previous exposure to influenza virus determines the functional properties of tissue-residing macrophages in a TLR-dependent manner [38]. Whether other TLR5-expressing haematopoeitic cells like dendritic cells cooperate with epithelium also remains to be further studied. Lastly, all the studies performed to date show that only TLR5 is crucial for the initiation of PMN recruitment into lungs and the alteration of airway resistance in response to free flagellin; this is not the case for intracellular sensors like IPAF and NAIP5 [47].

Here, we investigated the contribution of TLR4 and the CD14 co-receptor to the pulmonary immune response to flagellin. Previous *in vitro* studies have suggested that TLR4-TLR5 heterodimers detect flagellin and then produce nitric oxide (NO) and IFNβ in a STAT1-dependent manner [19]. The CD14 receptor is also required to potentiate immunity in response to various TLR agonists, in a TLR4-independent process [48-50]. Our results clearly show that TLR4- and CD14-deficient mice respond to flagellin in the same way as WT mice do (Figs 1-3). These data are corroborated by experiments on animals lacking the TRIF adaptor molecule used by TLR4. Hence, the flagellin-mediated lung innate response depends solely on the TLR5 receptor and the MyD88 adaptor.

Airway epithelial cells also produce chemokines (such as CCL20) that attract monocytes/dendritic cells and that may potentiate adaptive immunity in a mucosal adjuvant mechanism [34][51-55]. In contrast, flagellin may directly activate lung dendritic cells [48, 56]. In systemic activation, dendritic cells are directly activated by flagellin in a MyD88-dependent manner [41, 42] and this maturation is crucial for initiation of cellular and humoral adaptive immunity [57]. Flagellin also promotes bystander dendritic cell maturation via release of paracrine mediators from MyD88-competent radioresistant cells [41, 42]. It remains to be seen whether this type of mechanism (combined with *de novo* dendritic cell recruitment by specific chemokines) operates in lung tissue.

For Peer Review

Our data reveal that TLR-competent radioresistant cells (probably epithelial cells) are key players in respiratory innate responses to TLR agonists. In conclusion, we believe that understanding the unique role of epithelial TLR signaling and cross-talk with haematopoietic cells will open up new avenues for the manipulation of innate and adaptive mucosal defenses to pathogens.

For Peer Review

Materials and Methods

***Mice***

TLR5-/- [23], MyD88-/- [58], CD14-/- [59], TLR4-/- [60], and TRIF-/- [61] backcrossed at least 10 times on C57BL/6 genetic background as well as control C57BL/6 (CD45.2) or congenic CD45.1 counterpart C57BL/6-Ly5.1 were bred in our animal facility at the Transgenose Institute (CNRS, Orleans). For experiments, adult (6-10 weeks old) animals were kept in sterile isolated ventilated cages. All animal experiments complied with the French Government's ethical and animal experiment regulations.

***Flagellin administration and measurement of respiratory function***

LPS-depleted flagellin FliC from *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium (1µg) produced as described previously [56], LPS (10 µg) from *Escherichia coli* (serotype 055: B5, Sigma St Louis, MO, USA) or saline were given by the aerogenic route using nasal instillation in a volume of 40 µL under light ketamine-xylazine anaesthesia. The LPS concentration contamination as determined using the Limulus assay (Associates of Cape Cod Inc., USA) was less than 10 pg LPS per µg of FliC. When specified, flagellin was treated for 1h at 37°C with trypsin-EDTA 0.017% (Invitrogen, USA) to hydrolyze the protein, followed by heating at 70°C for 1h to inactivate trypsin. As mock control, wild type mice were administered with saline. The airway function was evaluated by whole-body plethysmography [6]. Unrestrained conscious mice were placed in plethysmography chambers (EMKA Technologies, France), and Enhanced respiratory Pause (PenH), measured over 3 to 6 hr. PenH can be conceptualized as the phase shift of the thoracic flow and the nasal flow curves indicating respiratory dysfunction pointing to airway resistance. Increased phase shift correlates with increased respiratory system resistance. PenH is calculated by the formula PenH = (Te/RT-1) x PEF/PIF, where Te is expiratory time, RT is relaxation time, PEF is peak expiratory flow, and PIF is peak inspiratory flow [62].

***Bronchoalveolar lavage fluid (BALF)***

BALF was collected 24 hr after flagellin or endotoxin administration by cannulating the trachea under deep ketamine-xylazine anaesthesia and washing the lung 4 times with 0.5 mL of saline at room temperature [62]. The lavage fluid was centrifuged 10 min at 2000 rpm 4°C and the



For Peer Review

supernatant was frozen for cytokine analysis. The cell pellet was suspended in PBS, counted in a haematocytometer chamber and cytospin preparations were made using a Shandon cytocentrifuge (1000 rpm, 10 min). The cells were stained with Diff-Quick (Dade Behring, Marburg, Germany). The supernatant was used for the measurement of cytokine and protein levels. TNF, IL-6 and KC (CXCL1) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (R&D Duoset, Minneapolis, MO).

***Microscopy and myeloperoxidase activity (MPO) in lung***

After bronchoalveolar lavage and lung perfusion, the mice were sacrificed. The lung were fixed in 4% buffered formaldehyde for standard microscopic analysis, 3 µm sections were stained with haematoxylin and eosin (H&E) [62]. Neutrophil and erythrocyte accumulation in alveoli, disruption of alveolar septae and activation of alveolar epithelial cells were quantified using a semi-quantitative score with increasing severity of changes (0-5) as described previously [6, 63]. Groups of 5-8 mice were included in each experiment and 10 randomly selected high power fields (400 x magnifications) per animal were analyzed.

Lung tissue MPO activity was evaluated as described [10]. In brief, the right heart ventricle was perfused with saline to flush the vascular content and lungs were frozen at -20°C until use. Lung was homogenized by Polytron, centrifuged and the supernatant was discarded. The pellets were suspended in 1 mL PBS containing 0.5% hexadecyltrimethyl ammonium bromide (HTAB) and 5 mM ethylene-diamine tetra-acetic acid (EDTA). Following centrifugation, 50 µL of supernatants were placed in test tubes with 200 µL PBS-HTAB-EDTA, 2 mL Hanks' balanced salt solution (HBSS), 100 µL of o-dianisidine dihydrochloride (1.25 mg/mL), and 100 µL $H_2O_2$ 0.05%. After 15 min of incubation at 37°C in an agitator, the reaction was stopped with 100 µL $NaN_3$ 1%. The MPO activity was determined as absorbance at 460 nm against medium.

***Bone marrow transplantation to obtain mixed chimera***

Recipient mice underwent a lethal total-body irradiation as reported [28, 29]. Fresh, unseparated bone marrow cells (3 x $10^6$ per mouse) were injected into the lateral tail vein of the irradiated recipient mice 24 hr after lethal irradiation (8 gray). The reconstituted mice were used at 3 months after bone marrow transplantation. The degree of chimerism for different haematopoietic-derived cells type was assessed by measuring CD45.1 and CD45.2 surface expression by blood leukocytes and alveolar macrophages in lung tissue. The current protocol



For Peer Review

yielded more than 96% of reconstitution in the blood; WT mice reconstituted with TLR5-deficient bone marrow presented 90% of CD11b+ CD45.2+ and TLR5-deficent mice reconstituted with WT bone marrow have more than 95 % of CD11b+ CD45.1+ in lung tissue.

***Cytokine gene expression.***

Total RNA from mouse lungs was extracted with the Nucleospin RNA II kit (Macherey Nagel, Germany) and reverse-transcribed with the High-Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, USA). The resulting cDNA was amplified using SYBR Green-based real-time PCR (Applied Biosystems). The specific primers are CGTCATCCATGGCGAACTG / GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT (*Actb* coding β-actin), CTTGGTTCAGAAAATTGTCCAAAA / CAGGTGCCATCAGAGCAGTCT (*Cxcl1*), TGGATCCAGAAGCTCCTGTGA / ATTCCGCTTAGCTTTCTTTTTGTC (*Cxcl5*), CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA / CCTCCACTTGGTGGTTTGCT (*Tnf*) and GTTCTCTGGGAAATCGTGGAAA / AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA (*Il6*). Relative mRNA levels ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) were determined by comparing (a) the PCR cycle thresholds (Ct) for the gene of interest and *Actb* (ΔCt) and (b) ΔCt values for treated and reference group (ΔΔCt), as described previously [56].

Relative expression levels of *Tlr5* mRNA were measured by qRT-PCR and were normalized to 18S RNA level using a standard curve method and the following primers for *Tlr5* (CGCACGGCTTTATCTTCTCC, GGCAAGGTTCAGCATCTTCAA) and 18S rRNA (TTGGCAAATGCTTTCGCTT, CGCCGCTAGAGGTGAAATTC). Results are expressed as geometric mean ± SEM. Alveolar epithelial cells and macrophages were isolated as described previously [27].

***Flow cytometry analysis***

Lung were minced with scissors and digested in HBSS containing collagenase II (200U/ml), DNase (50U/ml) during 2 hours at 37°c and filtered (100µm). Cells were then washed three times and counted. $10^6$ cells isolated from lung or BALF were stained for 30 min, 4°C in 50µl with anti-Ly6G-FITC and anti-CD11b-PerCP Cy5.5 in staining buffer (PBS/BSA 0,5 %). For intracellular staining, cells were permeabilized with Fixation/Permeabilization solution (Perm Wash, Beckton Dickinson) for 20 min at 4°C, and intracellular cytokine TNF was detected using



For Peer Review

anti-TNFα-APC during 30 min at 4°C. After extensive washes, cells were analyzed on a Becton Dickinson LSR analyzer. All antibodies were from Becton Dickinson.

***Statistical Analysis***

Statistical significance was determined by Student *t* test, Mann-Whitney and one-way ANOVA test (Bonferonni) using GraphPad software. *P* values of <0.05 were considered statistically significant.

For Peer Review

References

1 **Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O.,** Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006. **124**: 783-801.

2 **Kaisho, T. and Akira, S.,** Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* 2006. **117**: 979-987; quiz 988.

3 **Kline, J. N., Cowden, J. D., Hunninghake, G. W., Schutte, B. C., Watt, J. L., Wohlford-Lenane, C. L., Powers, L. S., Jones, M. P. and Schwartz, D. A.**, Variable airway responsiveness to inhaled lipopolysaccharide. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999. 160: 297-303.

4 **Arbour, N. C., Lorenz, E., Schutte, B. C., Zabner, J., Kline, J. N., Jones, M., Frees, K., Watt, J. L. and Schwartz, D. A.**, TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000. 25: 187-191.

5 **Lefort, J., Motreff, L. and Vargaftig, B. B.,** Airway administration of Escherichia coli endotoxin to mice induces glucocorticosteroid-resistant bronchoconstriction and vasopermeation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001. **24**: 345-351.

6 **Schnyder-Candrian, S., Quesniaux, V. F., Di Padova, F., Maillet, I., Noulin, N., Couillin, I., Moser, R., Erard, F., Vargaftig, B. B., Ryffel, B. and Schnyder, B.**, Dual Effects of p38 MAPK on TNF-Dependent Bronchoconstriction and TNF-Independent Neutrophil Recruitment in Lipopolysaccharide-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome. *J Immunol* 2005. 175: 262-269.

7 **Akira, S. and Takeda, K.,** Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004. **4**: 499-511.

8 **Andonegui, G., Goyert, S. M. and Kubes, P.,** Lipopolysaccharide-induced leukocyte-endothelial cell interactions: a role for CD14 versus toll-like receptor 4 within microvessels. *J Immunol* 2002. **169**: 2111-2119.

9 **Andonegui, G., Bonder, C. S., Green, F., Mullaly, S. C., Zbytnuik, L., Raharjo, E. and Kubes, P.,** Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs. *J Clin Invest* 2003. **112**: 1264.

10 **Lefort, J., Singer, M., Leduc, D., Renesto, P., Nahori, M. A., Huerre, M., Creminon, C., Chignard, M. and Vargaftig, B. B.,** Systemic administration of endotoxin induces

For Peer Review

bronchopulmonary hyperreactivity dissociated from TNF-alpha formation and neutrophil sequestration into the murine lungs. *J Immunol* 1998. **161**: 474-480.

11 **Noulin, N., Quesniaux, V. F., Schnyder-Candrian, S., Schnyder, B., Maillet, I., Robert, T., Vargaftig, B. B., Ryffel, B. and Couillin, I.**, Both hemopoietic and resident cells are required for MyD88-dependent pulmonary inflammatory response to inhaled endotoxin. *J Immunol* 2005. 175: 6861-6869.

12 **Schwartz, D. A., Thorne, P. S., Yagla, S. J., Burmeister, L. F., Olenchock, S. A., Watt, J. L. and Quinn, T. J.**, The role of endotoxin in grain dust-induced lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1995. 152: 603-608.

13 **Kennedy, S. M., Christiani, D. C., Eisen, E. A., Wegman, D. H., Greaves, I. A., Olenchock, S. A., Ye, T. T. and Lu, P. L.**, Cotton dust and endotoxin exposure-response relationships in cotton textile workers. *Am Rev Respir Dis* 1987. 135: 194-200.

14 **Donham, K., Haglind, P., Peterson, Y., Rylander, R. and Belin, L.,** Environmental and health studies of farm workers in Swedish swine confinement buildings. *Br J Ind Med* 1989. **46**: 31-37.

15 **Michel, O., Kips, J., Duchateau, J., Vertongen, F., Robert, L., Collet, H., Pauwels, R. and Sergysels, R.**, Severity of asthma is related to endotoxin in house dust. *Am J Respir Crit Care Med* 1996. 154: 1641-1646.

16 **Liu, A. H.,** Something old, something new: indoor endotoxin, allergens and asthma. *Paediatr Respir Rev* 2004. **5 Suppl A**: S65-71.

17 **Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M. and Aderem, A.**, The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001. 410: 1099-1103.

18 **Rumbo, M., Nempont, C., Kraehenbuhl, J. P. and Sirard, J. C.,** Mucosal interplay among commensal and pathogenic bacteria: lessons from flagellin and Toll-like receptor 5. *FEBS Lett* 2006. **580**: 2976-2984.

19 **Mizel, S. B., Honko, A. N., Moors, M. A., Smith, P. S. and West, A. P.,** Induction of macrophage nitric oxide production by Gram-negative flagellin involves signaling via heteromeric Toll-like receptor 5/Toll-like receptor 4 complexes. *J Immunol* 2003. **170**: 6217-6223.

20 **Hawn, T. R., Verbon, A., Lettinga, K. D., Zhao, L. P., Li, S. S., Laws, R. J., Skerrett, S. J., Beutler, B., Schroeder, L., Nachman, A., Ozinsky, A., Smith, K. D. and Aderem, A.**, A

For Peer Review

common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *J Exp Med* 2003. 198: 1563-1572.

21 **Gewirtz, A. T.,** Flag in the crossroads: flagellin modulates innate and adaptive immunity. *Curr Opin Gastroenterol* 2006. **22**: 8-12.

22 **Feuillet, V., Medjane, S., Mondor, I., Demaria, O., Pagni, P. P., Galan, J. E., Flavell, R. A. and Alexopoulou, L.,** Involvement of Toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006. **103**: 12487-12492.

23 **Uematsu, S., Jang, M. H., Chevrier, N., Guo, Z., Kumagai, Y., Yamamoto, M., Kato, H., Sougawa, N., Matsui, H., Kuwata, H., Hemmi, H., Coban, C., Kawai, T., Ishii, K. J., Takeuchi, O., Miyasaka, M., Takeda, K. and Akira, S.**, Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells. *Nat Immunol* 2006. 7: 868-874.

24 **Honko, A. N. and Mizel, S. B.,** Mucosal administration of flagellin induces innate immunity in the mouse lung. *Infect Immun* 2004. **72**: 6676-6679.

25 **Vijay-Kumar, M., Sanders, C. J., Taylor, R. T., Kumar, A., Aitken, J. D., Sitaraman, S. V., Neish, A. S., Uematsu, S., Akira, S., Williams, I. R. and Gewirtz, A. T.**, Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice. *J Clin Invest* 2007. 117: 3909-3921.

26 **Andersen-Nissen, E., Hawn, T. R., Smith, K. D., Nachman, A., Lampano, A. E., Uematsu, S., Akira, S. and Aderem, A.,** Cutting edge: Tlr5-/- mice are more susceptible to Escherichia coli urinary tract infection. *J Immunol* 2007. **178**: 4717-4720.

27 **Didierlaurent, A., Goulding, J., Patel, S., Snelgrove, R., Low, L., Bebien, M., Lawrence, T., van Rijt, L. S., Lambrecht, B. N., Sirard, J. C. and Hussell, T.**, Sustained desensitization to bacterial Toll-like receptor ligands after resolution of respiratory influenza infection. *J Exp Med* 2008. 205: 323-329.

28 **Muller, M., Eugster, H. P., Le Hir, M., Shakhov, A., Di Padova, F., Maurer, C., Quesniaux, V. F. and Ryffel, B.,** Correction or transfer of immunodeficiency due to TNF-LT alpha deletion by bone marrow transplantation. *Mol Med* 1996. **2**: 247-255.

29 **Ryffel, B., Di Padova, F., Schreier, M. H., Le Hir, M., Eugster, H. P. and Quesniaux, V. F.,** Lack of type 2 T cell-independent B cell responses and defect in isotype switching in TNF-lymphotoxin alpha-deficient mice. *J Immunol* 1997. **158**: 2126-2133.

30 **Liaudet, L., Szabo, C., Evgenov, O. V., Murthy, K. G., Pacher, P., Virag, L., Mabley, J. G., Marton, A., Soriano, F. G., Kirov, M. Y., Bjertnaes, L. J. and Salzman, A.**

For Peer Review

**L.**, Flagellin from gram-negative bacteria is a potent mediator of acute pulmonary inflammation in sepsis. *Shock* 2003. 19: 131-137.

31 **Cobb, L. M., Mychaleckyj, J. C., Wozniak, D. J. and Lopez-Boado, Y. S.,** Pseudomonas aeruginosa flagellin and alginate elicit very distinct gene expression patterns in airway epithelial cells: implications for cystic fibrosis disease. *J Immunol* 2004. **173**: 5659-5670.

32 **McNamara, N., Gallup, M., Sucher, A., Maltseva, I., McKemy, D. and Basbaum, C.,** AsialoGM1 and TLR5 cooperate in flagellin-induced nucleotide signaling to activate Erk1/2. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006. **34**: 653-660.

33 **Fritz, J. H., Le Bourhis, L., Magalhaes, J. G. and Philpott, D. J.,** Innate immune recognition at the epithelial barrier drives adaptive immunity: APCs take the back seat. *Trends Immunol* 2008. **29**: 41-49.

34 **Sha, Q., Truong-Tran, A. Q., Plitt, J. R., Beck, L. A. and Schleimer, R. P.,** Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004. **31**: 358-364.

35 **Zeng, H., Carlson, A. Q., Guo, Y., Yu, Y., Collier-Hyams, L. S., Madara, J. L., Gewirtz, A. T. and Neish, A. S.,** Flagellin is the major proinflammatory determinant of enteropathogenic Salmonella. *J Immunol* 2003. **171**: 3668-3674.

36 **Gewirtz, A. T., Simon, P. O., Jr., Schmitt, C. K., Taylor, L. J., Hagedorn, C. H., O'Brien, A. D., Neish, A. S. and Madara, J. L.**, Salmonella typhimurium translocates flagellin across intestinal epithelia, inducing a proinflammatory response. *J Clin Invest* 2001. 107: 99-109.

37 **Prince, A.,** Flagellar activation of epithelial signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006. **34**: 548-551.

38 **Hawn, T. R., Berrington, W. R., Smith, I. A., Uematsu, S., Akira, S., Aderem, A., Smith, K. D. and Skerrett, S. J.,** Altered inflammatory responses in TLR5-deficient mice infected with Legionella pneumophila. *J Immunol* 2007. **179**: 6981-6987.

39 **Uematsu, S., Fujimoto, K., Jang, M. H., Yang, B. G., Jung, Y. J., Nishiyama, M., Sato, S., Tsujimura, T., Yamamoto, M., Yokota, Y., Kiyono, H., Miyasaka, M., Ishii, K. J. and Akira, S.**, Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol* 2008. 9: 769-776.

40 **Koay, M. A., Gao, X., Washington, M. K., Parman, K. S., Sadikot, R. T., Blackwell, T. S. and Christman, J. W.,** Macrophages are necessary for maximal nuclear factor-kappa B activation in response to endotoxin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002. **26**: 572-578.



For Peer Review

41 **Sanders, C. J., Moore, D. A., 3rd, Williams, I. R. and Gewirtz, A. T.,** Both radioresistant and hemopoietic cells promote innate and adaptive immune responses to flagellin. *J Immunol* 2008. **180**: 7184-7192.

42 **Salazar-Gonzalez, R. M., Srinivasan, A., Griffin, A., Muralimohan, G., Ertelt, J. M., Ravindran, R., Vella, A. T. and McSorley, S. J.**, Salmonella flagellin induces bystander activation of splenic dendritic cells and hinders bacterial replication in vivo. *J Immunol* 2007. 179: 6169-6175.

43 **Takabayshi, K., Corr, M., Hayashi, T., Redecke, V., Beck, L., Guiney, D., Sheppard, D. and Raz, E.,** Induction of a homeostatic circuit in lung tissue by microbial compounds. *Immunity* 2006. **24**: 475-487.

44 **Munger, J. S., Huang, X., Kawakatsu, H., Griffiths, M. J., Dalton, S. L., Wu, J., Pittet, J. F., Kaminski, N., Garat, C., Matthay, M. A., Rifkin, D. B. and Sheppard, D.**, The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 1999. 96: 319-328.

45 **Underhill, D. M. and Ozinsky, A.,** Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol* 2002. **20**: 825-852.

46 **Gwinn, M. R. and Vallyathan, V.,** Respiratory burst: role in signal transduction in alveolar macrophages. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2006. **9**: 27-39.

47 **Benko, S., Philpott, D. J. and Girardin, S. E.,** The microbial and danger signals that activate Nod-like receptors. *Cytokine* 2008. **43**: 368-373.

48 **Lee, S. E., Kim, S. Y., Jeong, B. C., Kim, Y. R., Bae, S. J., Ahn, O. S., Lee, J. J., Song, H. C., Kim, J. M., Choy, H. E., Chung, S. S., Kweon, M. N. and Rhee, J. H.**, A bacterial flagellin, Vibrio vulnificus FlaB, has a strong mucosal adjuvant activity to induce protective immunity. *Infect Immun* 2006. 74: 694-702.

49 **Pauligk, C., Nain, M., Reiling, N., Gemsa, D. and Kaufmann, A.,** CD14 is required for influenza A virus-induced cytokine and chemokine production. *Immunobiology* 2004. **209**: 3-10.

50 **Janot, L., Secher, T., Torres, D., Maillet, I., Pfeilschifter, J., Quesniaux, V. F., Landmann, R., Ryffel, B. and Erard, F.,** CD14 works with toll-like receptor 2 to contribute to recognition and control of Listeria monocytogenes infection. *J Infect Dis* 2008. **198**: 115-124.

51 **Lopez-Boado, Y. S., Cobb, L. M. and Deora, R.,** Bordetella bronchiseptica flagellin is a proinflammatory determinant for airway epithelial cells. *Infect Immun* 2005. **73**: 7525-7534.

52 **Stumbles, P. A., Strickland, D. H., Pimm, C. L., Proksch, S. F., Marsh, A. M., McWilliam, A. S., Bosco, A., Tobagus, I., Thomas, J. A., Napoli, S., Proudfoot, A. E., Wells,**



For Peer Review

**T. N. and Holt, P. G.**, Regulation of dendritic cell recruitment into resting and inflamed airway epithelium: use of alternative chemokine receptors as a function of inducing stimulus. *J Immunol* 2001. 167: 228-234.

53 **Reibman, J., Hsu, Y., Chen, L. C., 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**: 648-654.

54 **Pino, O., Martin, M. and Michalek, S. M.,** Cellular mechanisms of the adjuvant activity of the flagellin component FljB of Salmonella enterica Serovar Typhimurium to potentiate mucosal and systemic responses. *Infect Immun* 2005. **73**: 6763-6770.

55 **Thorley, A. J., Goldstraw, P., Young, A. and Tetley, T. D.,** Primary human alveolar type II epithelial cell CCL20 (macrophage inflammatory protein-3alpha)-induced dendritic cell migration. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005. **32**: 262-267.

56 **Didierlaurent, A., Ferrero, I., Otten, L. A., Dubois, B., Reinhardt, M., Carlsen, H., Blomhoff, R., Akira, S., Kraehenbuhl, J. P. and Sirard, J. C.**, Flagellin promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2-type response. *J Immunol* 2004. 172: 6922-6930.

57 **Nolte, M. A., Leibundgut-Landmann, S., Joffre, O. and Reis e Sousa, C.,** Dendritic cell quiescence during systemic inflammation driven by LPS stimulation of radioresistant cells in vivo. *J Exp Med* 2007. **204**: 1487-1501.

58 **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**: 143-150.

59 **Moore, K. J., Andersson, L. P., Ingalls, R. R., Monks, B. G., Li, R., Arnaout, M. A., Golenbock, D. T. and Freeman, M. W.**, Divergent response to LPS and bacteria in CD14-deficient murine macrophages. *J Immunol* 2000. 165: 4272-4280.

60 **Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K. and Akira, S.,** Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 1999. **162**: 3749-3752.

61 **Hoebe, K., Du, X., Georgel, P., Janssen, E., Tabeta, K., Kim, S. O., Goode, J., Lin, P., Mann, N., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Han, J. and Beutler, B.**, Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* 2003. 424: 743-748.

For Peer Review

62 **Couillin, I., Maillet, I., Vargaftig, B. B., Jacobs, M., Paesen, G. C., Nuttall, P. A., Lefort, J., Moser, R., Weston-Davies, W. and Ryffel, B.**, Arthropod-derived histamine-binding protein prevents murine allergic asthma. *J Immunol* 2004. 173: 3281-3286.

63 **Drennan, M. B., Nicolle, D., Quesniaux, V. J., Jacobs, M., Allie, N., Mpagi, J., Fremond, C., Wagner, H., Kirschning, C. and Ryffel, B.**, Toll-like receptor 2-deficient mice succumb to Mycobacterium tuberculosis infection. *Am J Pathol* 2004. 164: 49-57.

For Peer Review

Figure Legends

***Figure 1: Flagellin-mediated alteration of respiratory function depends on TLR5 and MyD88.***

(A) The indicated mice were administered intranasally with saline (mock), flagellin (1µg) or trypsin-hydrolysed flagellin (1 µg equivalent) and then monitored by plethysmography. Respiratory function (PenH) was measured from 60 min to 360 min. The ventilatory function is expressed as mean +/- SEM of PenH. Native flagellin induced PenH in C57BL/6 mice (black squares) but not in *Tlr5* -/- animals. Saline and trypsin-hydrolysed flagellin did not increase PenH. (B) PenH in the indicated mice is expressed as area under the curve (AUC) measured from 60 to 360 minutes after flagellin (1µg) administration. Data are from one representative experiment of three (n=4 mice per group). Statistical analysis was performed using Student *t* test (*p<0.05 ; **p<0.01).

***Figure 2: TLR5- and MyD88-dependent neutrophil recruitment in the lung of flagellin-stimulated mice.***

The indicated mice were administered intranasally with saline (mock) or flagellin (1µg). (A, B) BALF was collected after 24 h and (A) the total number of cells and (B) the cellular composition determined. (C) Lungs were lysed 24h after flagellin administration and MPO activity measured in the lysates to assess neutrophil infiltration in the lung tissue. Data are from one representative experiment of three and are expressed as mean +/- SD (n=4 mice per group). Statistical analysis was performed using Student *t* test (*p<0.05 ; **p<0.01 ; ***p<0.001).

***Figure 3: Histological analysis of neutrophil infiltration in lungs of flagellin-stimulated wild type and TLR-deficient animals.***

Animals were administered intranasally with saline (mock), flagellin (1µg), trypsin-treated flagellin (1µg equivalent), or LPS (1µg). The lungs of C57BL/6, *Tlr4-/-, Tlr5-/-, Cd14-/-, Myd88-/-* and *Trif-/-* mice were analysed by microscopy 24h later. (A) Representative histology in C57BL/6 animals (magnification x200 and x400 in inserts, HE coloration). (B) The PMN infiltration in flagellin-treated mice was assessed by a semi-quantitative score. The neutrophil infiltration observed in C57BL/6, *Tlr4-/-, Cd14-/-,* and *Trif-/-* mice was absent in *Tlr5-/-* and *Myd88-/-* mice. The same pattern was observed for the disruption of the microarchitecture and the activation of alveolar epithelia (data not shown). Data are from one representative



For Peer Review

experiment out of three and are expressed as mean values +/- SD (n=4 mice per group; Statistical analysis was performed using Student *t* test (**p<0.01 ; ***p<0.001).

***Figure 4: Major role of radioresistant cells in flagellin-specific respiratory function and neutrophil infiltration.***

Chimeric mice generated by injection of bone marrow from C57BL/6 (WT) or TLR5-deficient (KO) mice into KO or WT mice respectively and 1µg flagellin administered intransally. (A) Respiratory function (PenH) was measured from 60 min to 180 min. (B) Cell composition of BALF and (C) MPO activity in lung homogenates 4h after flagellin administration. Data are expressed as mean +/- SD (n=4 mice per group; Student *t* test *p<0.05 ; **p<0.01 ; ***p<0.001). Data are from one representative experiment out of two

***Figure 5: Cell compartmentalization of TLR5-dependent lung production of chemokines and cytokines***

Chimeric mice generated by injection of bone marrow from C57BL/6 (WT) or TLR5-deficient (KO) mice into KO or WT mice respectively and 1µg flagellin was administered intranasally. Analysis was performed 4h later. (A) CXCL1 production in lung homogenates. (B) TNFα and (C) IL-6 production in BALF. (D) Intracellular staining of TNFα in lung cells. (A-C) Data are expressed as mean +/- SD (n=4 mice per group. (D) Diamonds represent data from individual mice. One way ANOVA test *p<0.05 ; **p<0.01 ; ***p<0.001; n.d., not determined. Data are from representative experiment out of two. Statistical significance was determined by one-way ANOVA test using GraphPad software for all panels in Fig.5.

***Figure 6: Chemokines and cytokines gene transcription in lungs of chimeric mice***

Chimeric mice generated by injection of bone marrow from C57BL/6 (WT) or TLR5-deficient (KO) mice into KO or WT mice respectively and 1µg flagellin administered intransally. Analysis was performed 4h later. Relative (A) *Cxcl5*, (B) *Cxcl1,* (C) *Tnf,* and (D) *Il6* mRNA levels. Values were determined by RT-PCR using KO>KO as the calibrating condition. Data are expressed as mean +/- SD (n=4 mice per group; Mann-Withney test. *p<0.05; **p<0.01

For Peer Review

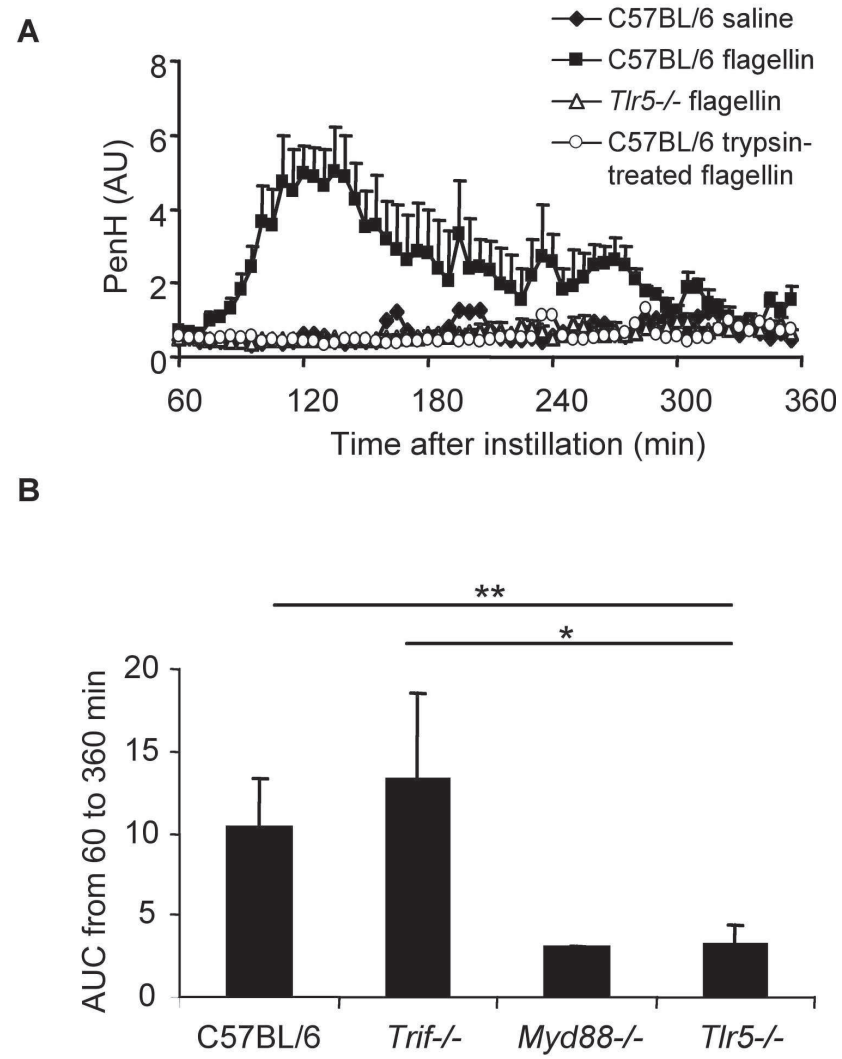



**Figure 1 Janot *et al.***

129x181mm (600 x 600 DPI)

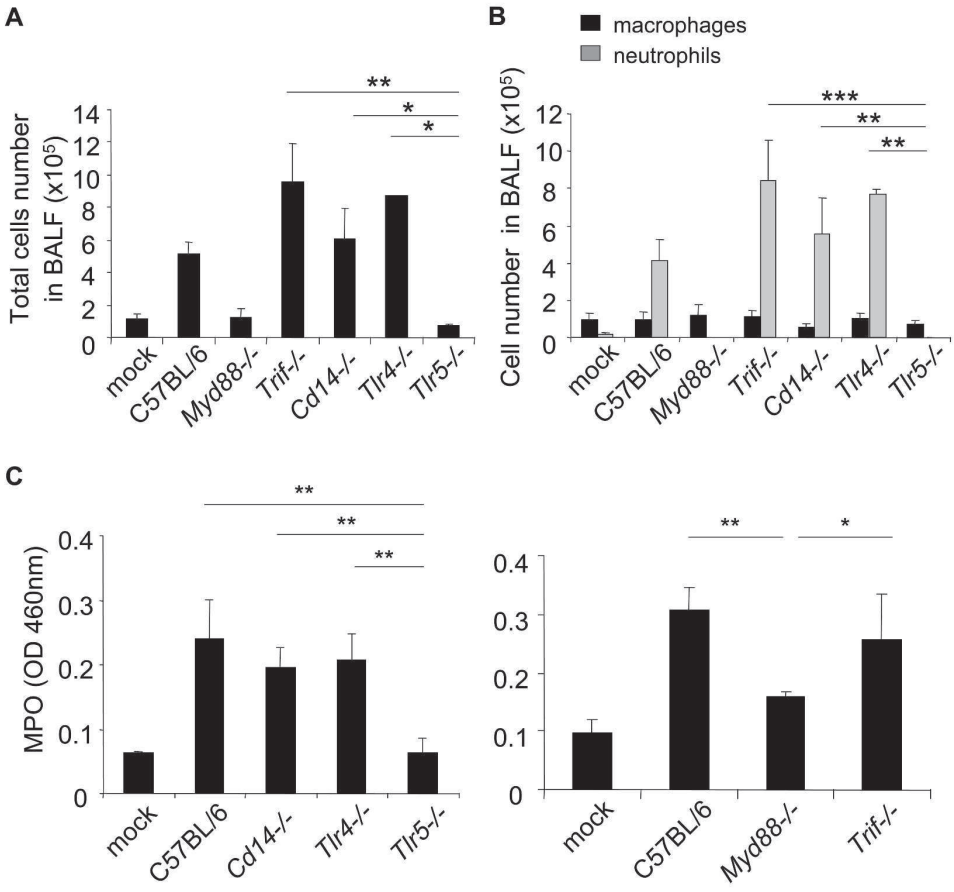



**Figure 2 Janot *et al.***

141x142mm (600 x 600 DPI)

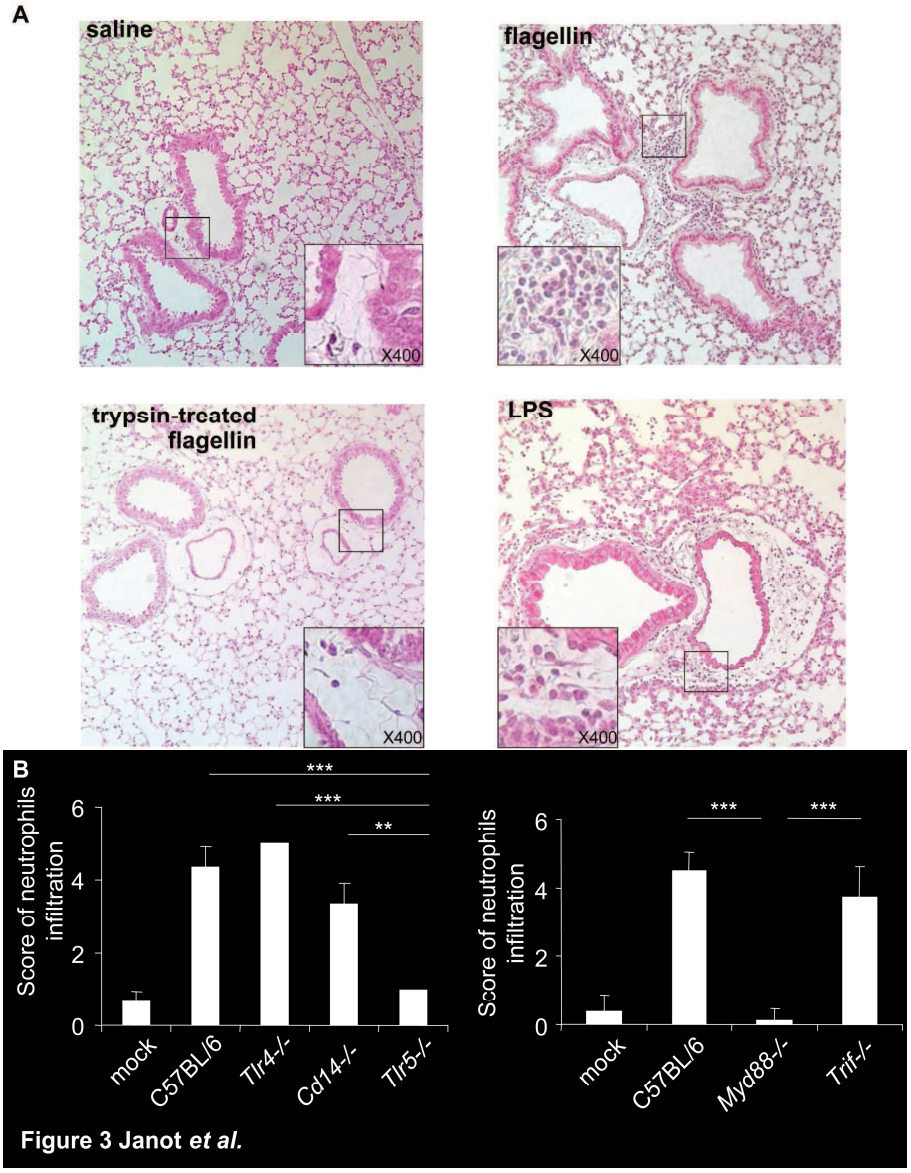



Figure 3 Janot *et al.*

142x183mm (600 x 600 DPI)

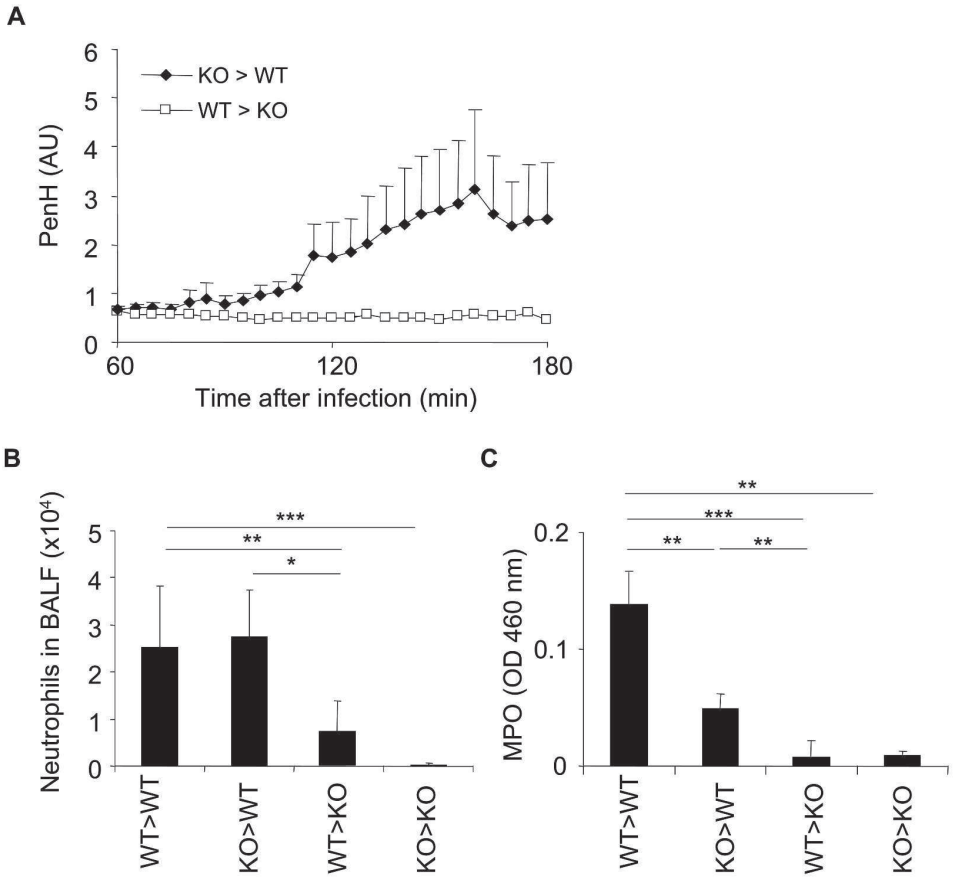



**Figure 4 Janot *et al.***

139x138mm (600 x 600 DPI)

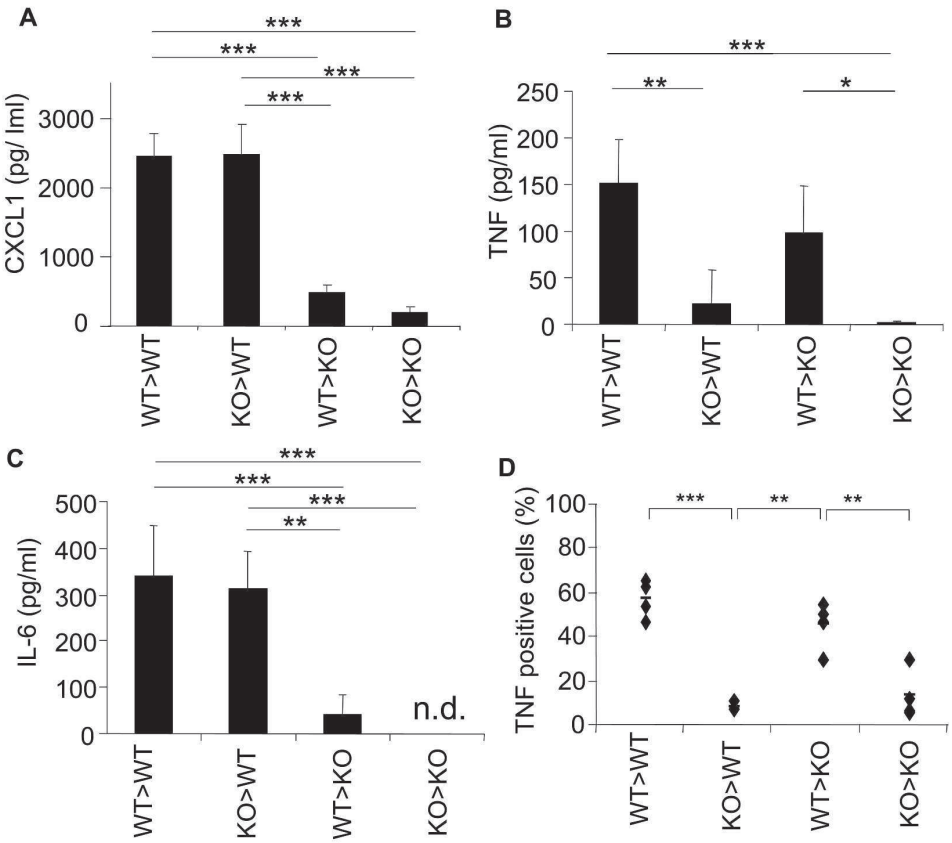



**Figure 5 Janot *et al.***

142x142mm (600 x 600 DPI)

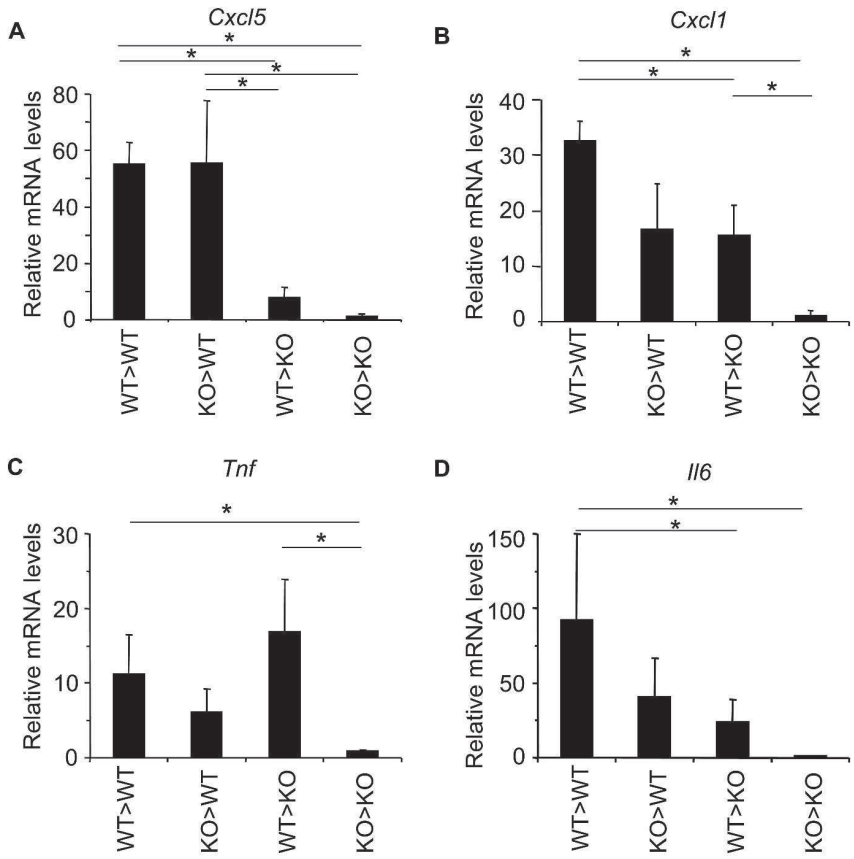



**Figure 6 Janot *et al.***

185x241mm (600 x 600 DPI)

# DISCUSSION

Les travaux que j'ai réalisés durant ma thèse m'ont permis de découvrir plusieurs rôles de l'immunité innée. Notre système immunitaire est complexe et fait intervenir diverses cellules, immunitaires ou non, produit tout un éventail de cytokines ou chimiokines aux rôles différents. Tous ces acteurs n'ont pourtant qu'un seul but, celui de maintenir l'équilibre immunitaire de l'organisme. J'ai donc pu aborder un premier aspect de l'immunité innée en étudiant la relation hôte-pathogène dans un modèle d'infection par Listéria admnistrée par voie veineuse. Les TLR font partie des récepteurs indispensables à la détection des agents infectieux. Ils entretiennent un réseau efficace de défense de part leur possible association en hétérodimère, ou avec des molécules accessoires, ainsi que par l'utilisation de différentes protéines adaptatrices afin de transmettre l'information. Chacune de ces molécules aura un rôle différent selon le mode d'infection employé mais également suivant l'organe que l'on considère. J'ai donc pu découvrir dans une deuxième partie de mes travaux comment s'organise la réponse immunitaire innée au sein des muqueuses et constater qu'elle joue un rôle important dans la réponse pulmonaire induite par la flagelline issue de *Salmonella typhimurium*. Au fur et à mesure de ce travail, j'ai pu me rendre compte que les TLR et leurs cytokines, en plus de remplir un rôle certain dans la défense contre les pathogènes, sont indispensables à l'homéostasie des tissus. L'existence de maladies inflammatoires comme la maladie de Crohn ou l'arthrite rhumatoide permet de constater que ce système comporte parfois des défaillances et peut s'emballer. Les thérapeutiques actuelles reposent sur des traitements anti-TNF stoppant l'inflammation chronique mais déplétent considérablement l'organisme de son système immunitaire. On voit ici combien il est difficile de préserver l'équilibre immunitaire. J'ai été très intéressée de participer à l'étude menée par la société Xencor dans sa recherche d'une alternative médicamenteuse afin substituer les effets négatifs des traitements anti-TNF.

L'organisme peut être exposé à divers agents infectieux et met très rapidement en place la réponse immunitaire innée impliquant la détection des agents pathogènes par les TLR. Des études menées dans notre laboratoire sont en accord avec les travaux de Ozoren et mettent en évidence le rôle du TLR2 dans la détection de la Listéria puisque les souris déficientes en cette protéine sont sensibles à l'infection par cette bactérie

(92, 396). Ces résultats sont en contradiction avec certains travaux mais peuvent s'expliquer par l'utilisation des différents modes d'administration (intrapéritonéale versus intraveineuse) de la Listéria (242). Par ailleurs, il apparait que le co-récepteur CD14 n'est pas seulement impliqué dans la détection et le transfert du LPS au complexe MD-2/TLR4 (131). Lee et col. ont en effet mis en évidence la liaison de CD14 avec les doubles brins d'ARN et son intéraction avec le TLR3 (141). Ces résultats ont conforté notre hypothèse que CD14 pouvait intervenir avec TLR2 dans la détection de la Listéria. La stimulation des macrophages CD14-/- et TLR2-/- dérivés de moelle osseuse a mis en évidence un défaut de production des cytokines inflammatoires TNF, IL12p40 et IL-6 ainsi qu'une diminution de l'expression de NO. Ces résultats sont en conformité, d'une part avec ceux obtenus à partir des macrophages issus de souris TLR2-/- (396) et d'autres part, avec ceux obtenus par la neutralisation du CD14 sur les cellules CHO-TLR2 stimulées par HKLM (140). L'analyse confocale des BMDM TLR2-/- et CD14-/- stimulés par Listéria a révélé un défaut de translocation nucléaire du facteur de transcription NF-κB qui peut être corrélé à la diminution de la production des cytokines inflammatoires.

En revanche, bien que les macrophages CD14-/- présentent une baisse de production du NO, nos tests *in vitro* sur la charge bactérienne des BMDM n'ont pas pu mettre en évidence de défaut d'élimination des bactéries. La synthèse de dérivés azotés comme le NO est connu pour intervenir dans les processus d'élimination des bactéries comme *Listeria* (230) ou *Mycobacter* (229). L'organisme dispose de plusieurs moyens afin de limiter l'expansion des pathogènes et utilise les dérivés oxygénés produits par l'oxydase des phagocytes $pg91^{phox}$ afin de compléter l'action du NO (230). Ainsi, les souris deficientes en $pg91^{phox}$ et en NOS2 sont très susceptibles à l'infection par Listéria (230).

La survie des souris infectées par Listéria met en évidence un même phénotype pour les animaux TLR2-/- et CD14-/-, à savoir une susceptiblité à l'infection avec 40% et 20% de survie, respectivement. Ce résultat va de paire avec la charge bactérienne élevée dans le foie et la rate. Le pourcentage de survie des souris double déficientes TLR2/CD14-/- est par ailleurs proche de celui obtenu chez les animaux simples déficients, révélant ainsi l'absence d'effet additif de ces deux protéines. Par ailleurs, des travaux

complémentaires montrent que TLR2 s'associe au TLR6 et non à TLR1 dans la reconnaissance de la Listéria (non publié). Or, il s'avère que la détection des ligands de l'hétérodimère TLR2-TLR6, Pam2CSK4 ou MALP2, requiert l'intervention de CD14, ce qui confirme nos résultats (86, 397). Par ailleurs, les souris MyD88-/-, connues pour être très susceptibles à l'infection par Listéria (241, 242), succombent toutes à l'infection contrairement aux souris CD14-/- et TLR2-/- nous obligeant à envisager l'implication d'un autre récepteur afin d'expliquer cette différence de phénotype. Les infections réalisées au laboratoire sur les souris TLR9-/-, TLR4-/-, TLR3-/- montrent que ces récepteurs n'interviennent pas dans la réponse à Listéria. De plus, Listéria possède un flagelle et on peut s'intérroger sur la possible reconnaissance de la bactérie par TLR5. Les résultats de Way suggèrent que la flagelline n'est pas essentielle à la pathogenèse de la listériose après administration intraveineuse ou intragastrique (244). Nous avons étudié la réponse des souris TLR5-/- après infection intranasale par Listéria et nous avons constaté que ces souris présentent un phénotype identique aux souris sauvages (non publié). Ces résultats impliquent effectivement qu'un autre récepteur emprunte la voie Myd88 afin d'établir une réponse contre la Listéria. Les travaux d'Edelson et col. vont d'ailleurs dans ce sens en montrant la production d'IL-1 et d'IL-18 de manière dépendante de MyD88 et indépendante de TLR2 (242). Le récepteur à l'IL-1 pourrait donc être impliqué dans la mise en place de la réponse contre Listéria. Des travaux ont montré l'IL-1R est essentiel dans le contrôle de la listériose cérébrale mais non systémique (398). Il est à noter dans cette étude que la voie d'injection diffère de nos procédures expérimentales puisque nous administrons la Listéria en intraveineuse.
Il pourrait être intéressant de produire des souris TLR2/IL1R double déficientes pour voir s'il elles ne montreraient pas la même sensibilité que des souris MyD88-/- en réponse à la listéria. Un antagoniste de l'IL-1R pourrait également être administré à des souris déficientes en TLR2 afin de comparer leur phénotype aux souris MyD88-/-.

Les études histologiques du tissu hépatique mettent en évidence un nombre important de microabcès chez les souris CD14-/-. Ces structures, également observées chez les animaux sauvages avec une fréquence moindre, sont de taille importante en raison du recrutement intense des neutrophiles. CD14 pourrait donc être impliqué dans la mobilisation des neutrophiles sur le site de l'infection. Ainsi, les souris CD14-/-

présentent une augmentation de l'expression de CXCR2 et MIP2 dans les infections aux streptocoques (399). Dans le cas de l'infection par Listéria, les neutrophiles et les macrophages recrutés semblent limités dans leur capacité à éliminer les bactéries puisque le marquage immunohistochimique du tissu hépatique ne revèle qu'une faible activité de la syntase d'oxyde nitrique, iNOS. L'organisme ne peut pas contrôler la prolifération des bactéries.

Le co-récepteur CD14 est donc impliqué avec TLR2 dans la reconnaissance de la Listéria. Il régule la migration des neutrophiles et permet la synthèse de NO afin d'éliminer les bactéries. CD14 est également impliqué au niveau pulmonaire dans les réponses immunitaires mises en place après infection par *Burkholderia pseudomallei* (400) et *Streptococcus pneumoniae* (401). Dans la mesure où ce co-récepteur intervient comme nous l'avons vu avec les TLR2, TLR4 et TLR3, nous avons exploré la piste de la possible coopération entre CD14 et TLR5 dans la réponse à la flagelline issue de S. *typhimurium*. De plus, les travaux de Mizel établissent que TLR5 pourrait former un hétérodimère avec TLR4 dans la réponse à cette protéine afin de permettre la production de NO par les macrophages (368). L'administration intranasale de flagelline à des souris déficientes en TLR4 et en CD14 permet de constater que ces animaux présentent le même phénotype que les souris sauvages avec la présence de neutrophiles dans le lavage bronchoalvéolaire ainsi que dans le parenchyme et les alvéoles pulmonaires. La détection de la flagelline par l'hétérodimère TLR4-TLR5 apparait donc peu probable d'autant que les animaux déficients pour Trif, la protéine adaptatrice de TLR4, répondent elles aussi comme les C57BL/6. La réponse à la flagelline semble dépendante uniquement de TLR5 et MyD88 et vont dans le sens d'autres travaux (97, 402).

Par ailleurs, la création de souris chimériques nous a permis de nous intéresser de plus près à l'implication des cellules radiorésistantes, composées majoritairement de cellules épithéliales, versus le rôle des cellules myéloides dans la réponse à la flagelline. Les cellules myéloides n'expriment que très peu TLR5 (360), ce que j'ai pu confirmer devant l'absence de production de cytokines inflammatoires telles que le TNF ou l'IL-6 après stimulation des BMDM ou BMDC par la flagelline (non publié). Les cellules épithéliales sont quant à elles en contact direct avec les particules inhalées ainsi que les

pathogènes et sont garantes de l'intégrité du tissu pulmonaire. Il ne fait aucun doute que TLR5 est exprimé par les cellules épithéliales, qu'elles soient pulmonaires ou intestinales (403, 404). Celles-ci produisent des chimiokines recrutant les neutrophiles (CXCL1, CXCL5) ainsi que des cytokines inflammatoires (TNF, IL-6) et des peptides antimicrobiens comme le NO (405). Noulin et col. ont montré que les cellules radiorésistantes sont à l'origine d'une constriction de l'appareil respiratoire en réponse LPS alors que la production de TNF et IL-12p40 dépend de la voie MyD88 des cellules myéloides (406). En revanche, le recrutement des neutrophiles dans le tissu pulmonaire requiert l'expression de MyD88 sur les deux types de cellules (406). Nos souris chimériques sauvages reconstituées avec la moelle des souris déficientes en TLR5 présentent des neutrophiles dans le BAL ainsi que dans le parenchyme pulmonaire et les alvéoles. Cet afflux de cellules immunitaires est corrélé avec la production des chimiokines CXCL1 et CXCL5, confirmant ainsi le rôle primordiale des cellules radiorésistantes dans l'initiation de la réponse immunitaire comme l'avaient suggéré Feuillet et col. (361).

Egalement en accord avec ces travaux, nous avons observé que la production des cytokines TNF et IL-6 dépend de l'activation des cellules myéloides. Dans le cas de l'inflammation induite par la flagelline, il apparait donc que les cellules épithéliales produisent les chimiokines permettant l'afflux de neutrophiles alors que les cellules myéloides produisent les cytokines inflammatoires. Sanders et col. ont eux aussi étudié le rôle de ces deux types de cellules dans l'immunité innée mais aussi adaptative en réponse à la flagelline dans un modèle de chimères pour MyD88 (370). Ils ont observé que les cellules radiorésistantes sont à l'origine de la sécrétion des chimioatractant KC, IP-10 et MCP-1 alors que les cellules radiosensibles produisent la majorité du TNF, IL-12 et IL-6. Les macrophages alvéolaires constituent une population cellulaire intéressante au regard de leur rôle dans la défense contre les pathogènes et dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Les macrophages alvéolaires et les cellules épithéliales expriment TLR5 de manière similaire (407). Identifiés comme une source importante de TNF après stimulation par flagelline (407, 408), les macrophages alvéolaires ont un rôle encore peu clair dans la défense de l'organisme contre les pathogènes. Cette population cellulaire entretient des rélations étroites avec les

cellules épithéliales et modulent leur réponse immunitaire selon les signaux reçus par les cellules résidentes (317, 409). Les macrophages alvéolaires sont maintenus dans un état quiescent tant que les cellules épithéliales ne détectent pas de danger. En revanche, lorsque l'intégrité de la barrière épithéliale est menacée, l'activation des TLR exprimés par les cellules épithéliales permet d'avertir les macrophages alévolaires afin qu'ils puissent exercer leur fonction de phagocytose et d'élimination des bactéries (410, 411). Par ailleurs, la réponse humorale en réponse à la flagelline n'est observée seulement lorsque MyD88 est présent dans les compartiments hématopoiétiques et non-hématopoiétiques et la production des cytokines inflammatoires par les cellules radiosensibles et radioréistantes conditionne la réponse anticorps spécifique de la flagelline (370). Les cellules dendritiques assurent le lien entre immunuté innée et adaptative. Compte tenu de la faible expression du TLR5 sur les DC (360), il semble raisonnable de penser que l'activation de ces cellules se fasse de manière indirecte, grâce à la sécrétion de médiateurs par les cellules non hématopoiétiques. Salazar-Gonzalez et col. ont effectivement démontré que l'activation des DC spléniques, après injection par voie veineuse de flagelline, s'effectue de manière indirecte (371). Ce point est à éclaircir car Uematsu et col. ont observé que les DC de la lamina propria intestinale répondent à la flagelline de manière directe et pourraient donc activer les DC spléniques suite à une injection systémique de flagelline (357).

L'immunité innée intervient donc à deux titres et a la tâche complexe de répondre ou non à toute une variétée d'antigènes. De part leur vaste surface, les muqueuses pulmonaires, urinaires ou intestinales ont la lourde tâche de maintenir une tolérance immunitaire vis-à-vis des particules inhalées ou envers la flore commensale tout en restant en alerte en cas de colonisation par des pathogènes.

Il arrive parfois que le système immunitaire défaille et soit à l'origine de maladie inflammatoires dont les causes sont multifactorielles. Vijay-Kumar et col. ont montrer que la déficience en TLR5 induit spontanément une colite ulcérative chez les animaux TLR5-/-, indiquant que ce récepteur protège les intestins de la flore commensale (367). Certains patients souffrant de la maladie de Crohn présentent dans le sérum une forte

réponse anticorps spécifique de la flagelline appartenant aux bactéries peuplant les intestins (412, 413).

Il existe bien d'autres maladies où le système immunitaire est complètement dérégulé et l'arthrite rhumatoide en est un exemple. Cette maladie complexe touche les articulations et fait intervenir bon nombre de cellules, immunitaires ou non, telles que les fibroblastes, les ostéoclastes, les cellules T ou encore les macrophages (414). Une susceptibilité génétique associée aux conditions environnementales conduit d'abord à une autoimmunité puis à une inflammation chronique ou le TNF prend une place importante (415). En effet, tout comme la maladie de Crohn, le traitement de l'arthrite rhumatoide repose sur les traitements anti -TNF.

Les anti-TNF actuels consistent en l'administration de protéines de fusion d'une immunoglobuline avec le TNFR2 ou celle d'anticorps neutralisant le TNF (32). Ces traitements sont très efficaces sur l'inflammation chronique, mais certains patients montrent une susceptibilité aux infections opportunistes comme la listériose ou la tuberculose (53-55). La création du dominant-négatif DN-TNF s'inscrit dans la perspective de développer des traitements anti-TNF autres que ceux employés actuellement en clinique (56). Notre étude du rôle du TNF dans l'infection par *Listeria monocytogenes*, à la base fondamentale, contribue dans une certaine mesure à la recherche clinique développée afin de soulager les patients. Nos travaux ont mis en lumière le rôle important que pouvait avoir la forme membranaire du TNF. Nous avons pu observer qu'*in vitro*, les macrophages sont capables de produire le NO afin d'éliminer la Listéria. *In vivo*, la seule expression du Mem-TNF permet, comparativement aux souris TNF-/-, de réduire la charge bactérienne dans le foie et la rate. Même si les animaux Mem-TNF présentent un nombre de microabcès hépatiques importants, on a constaté que ces structures sont de taille identique à celle des souris sauvages témoignant ainsi du contrôle de l'afflux de neutrophiles par le TNF membranaire sur le lieu de l'inflammation. Nos travaux viennent confirmer les études réalisées sur l'implication du Mem-TNF dans l'infection par les mycobactéries sur les même souris Knock In (416) ou sur l'autre modèle de souris transgéniques un peu moins physiologiques (390). Cette résistance conférée par le Mem-TNF indique qu'il agit par contact cellulaire avec les

macrophages ou les cellules T directement sur le site de l'infection. Il a d'ailleurs été montré que le TNF doit être produit localement lors d'infections par des pathogènes intracellulaires (417) et l'administration de TNF par voie systémique est inefficace (418). Le sTNF et le Mem-TNF pourrait exercer leur différentes fonctions selon le récepteur qu'ils utilisent. Plusieurs études rapportent que le TNF membranaire peut induire un signal grâce à TNFR1 et TNFR2 (419-421). De plus, les cellules exprimant le Mem-TNF disposent d'un autre moyen de signalisation grâce au signal inverse qu'elles peuvent mettre en place (43, 44). Les travaux menés dans notre laboratoire mettent en évidence que les souris TNFR2-/- sont résistantes à l'infection par Listéria (non publié) et divers articles montrent que ce sont les souris TNFR1-/- qui sont sensibles ce pathogène (38, 227). Le Mem-TNF pourrait donc utiliser le TNFR1 comme récepteur dans la réponse contre Listéria. Par ailleurs, il apparait que les cellules T CD8 interviennent dans la médiation cellulaire permettant le développement de l'immmunité contre Listéria (243). Le transfert adoptif de splénocytes provenant de souris Mem-TNF immunisées et transférées à des souris receveuses TNF-/- permet de protéger ces souris. En effet, ces 80% de ces dernières survivent à l'infection et présentent une charge bactérienne réduite en comparaison des souris TNF-/- recevant les splénocytes de souris TNF-/- immunisées. Le contact cellulaire des cellules T Mem-TNF transférées lors de cette expérience permet d'induire localement l'activation des macrophages afin de produire le NO indispensable à l'élimination des bactéries (229). Nos travaux suggèrent ainsi que l'expression du TNF membranaire sur les cellules T permet de protéger les souris TNF-/- de l'infection par Listéria.

Ce rôle intéressant du TNF membranaire est d'autant plus important dans le cadre des traitements utilisés pour soigner l'arthrite rhumatoïde. Certaines observations cliniques chez l'humain ou dans certaines expérimentations suggèrent que le TNF soluble est associé à des inflammations chroniques (392, 422) alors que le Mem-TNF intervient plutôt dans la résolution de l'inflammation (423, 424). Ainsi, le dominant-négatif du TNF permet de neutraliser le TNF soluble uniquement tout en laissant le Mem-TNF exercer ses fonctions. Le DN-TNF a pu être testé dans l'infection par Listéria sur des souris sauvages C57/BL6 puis sur des souris Mem-TNF. Contrairement aux autres traitements comme l'étanercept, le DN-TNF préserve l'immunité innée des

souris sauvages mais également celle des souris Mem-TNF montrant ainsi la spécificité d'action de nouveau composé. Le DN-TNF montre de plus les mêmes capacités que les autres anti-TNF à traiter l'arthrite dans les deux modèles induits dans le cadre de l'étude.

Les divers travaux effectués durant ma thèse ont donc mis en évidence le rôle important de l'immunité innée au travers de l'action des TLR et leurs molécules accessoires. La listériose est un modèle d'étude immunologique permettant de mieux comprendre le système immunitaire dans son ensemble. Cette compréhension devrait nous permettre de mieux intégrer les notions d'immunité dans l'analyse clinique de certaines pathologies infectieuses afin de mieux les traiter.

# BIBLIOGRAPHIE

1. Weber, C., L. Fraemohs, and E. Dejana. 2007. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol* 7:467-477.
2. McEver, R. P. 2002. Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Curr Opin Cell Biol* 14:581-586.
3. Barreiro, O., M. Yanez-Mo, J. M. Serrador, M. C. Montoya, M. Vicente-Manzanares, R. Tejedor, H. Furthmayr, and F. Sanchez-Madrid. 2002. Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. *J Cell Biol* 157:1233-1245.
4. Luscinskas, F. W., S. Ma, A. Nusrat, C. A. Parkos, and S. K. Shaw. 2002. Leukocyte transendothelial migration: a junctional affair. *Semin Immunol* 14:105-113.
5. Cinamon, G., V. Shinder, and R. Alon. 2001. Shear forces promote lymphocyte migration across vascular endothelium bearing apical chemokines. *Nat Immunol* 2:515-522.
6. Bevilacqua, M. P., J. S. Pober, G. R. Majeau, W. Fiers, R. S. Cotran, and M. A. Gimbrone, Jr. 1986. Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4533-4537.
7. Bates, D. O., and S. J. Harper. 2002. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Vascul Pharmacol* 39:225-237.
8. Giraudo, E., L. Primo, E. Audero, H. P. Gerber, P. Koolwijk, S. Soker, M. Klagsbrun, N. Ferrara, and F. Bussolino. 1998. Tumor necrosis factor-alpha regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and of its co-receptor neuropilin-1 in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 273:22128-22135.
9. Pardi, R., L. Inverardi, and J. R. Bender. 1992. Regulatory mechanisms in leukocyte adhesion: flexible receptors for sophisticated travelers. *Immunol Today* 13:224-230.
10. Ley, K., C. Laudanna, M. I. Cybulsky, and S. Nourshargh. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7:678-689.
11. Klir, J. J., J. Roth, Z. Szelenyi, J. L. McClellan, and M. J. Kluger. 1993. Role of hypothalamic interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in LPS fever in rat. *Am J Physiol* 265:R512-517.
12. Aggarwal, B. B. 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3:745-756.
13. Shear, M. J. T., F.C. 1943. Chemical treatment ot tumors. Isolation of the hemorrhage-producing fraction from Serratia marcescens (Bacillus prodigiosus) culture filtrate. In *J. Natl Cancer Inst*. 81-97
14. Carswell, E. A., L. J. Old, R. L. Kassel, S. Green, N. Fiore, and B. Williamson. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:3666-3670.
15. Aggarwal, B. B., B. Moffat, and R. N. Harkins. 1984. Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization. *J Biol Chem* 259:686-691.
16. Pennica, D., G. E. Nedwin, J. S. Hayflick, P. H. Seeburg, R. Derynck, M. A. Palladino, W. J. Kohr, B. B. Aggarwal, and D. V. Goeddel. 1984. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312:724-729.
17. Aggarwal, B. B., W. J. Henzel, B. Moffat, W. J. Kohr, and R. N. Harkins. 1985. Primary structure of human lymphotoxin derived from 1788 lymphoblastoid cell line. *J Biol Chem* 260:2334-2344.

18. Beutler, B., D. Greenwald, J. D. Hulmes, M. Chang, Y. C. Pan, J. Mathison, R. Ulevitch, and A. Cerami. 1985. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* 316:552-554.
19. Takeda, K., S. Iwamoto, H. Sugimoto, T. Takuma, N. Kawatani, M. Noda, A. Masaki, H. Morise, H. Arimura, and K. Konno. 1986. Identity of differentiation inducing factor and tumour necrosis factor. *Nature* 323:338-340.
20. Smith, C. A., T. Farrah, and R. G. Goodwin. 1994. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76:959-962.
21. Yonehara, S., A. Ishii, and M. Yonehara. 1989. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* 169:1747-1756.
22. Locksley, R. M., N. Killeen, and M. J. Lenardo. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104:487-501.
23. Black, R. A. 2002. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *Int J Biochem Cell Biol* 34:1-5.
24. Gearing, A. J., P. Beckett, M. Christodoulou, M. Churchill, J. Clements, A. H. Davidson, A. H. Drummond, W. A. Galloway, R. Gilbert, J. L. Gordon, and et al. 1994. Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature* 370:555-557.
25. Vassalli, P. 1992. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 10:411-452.
26. Zhou, L. J., and T. F. Tedder. 1995. A distinct pattern of cytokine gene expression by human CD83+ blood dendritic cells. *Blood* 86:3295-3301.
27. Ware, C. F., P. D. Crowe, M. H. Grayson, M. J. Androlewicz, and J. L. Browning. 1992. Expression of surface lymphotoxin and tumor necrosis factor on activated T, B, and natural killer cells. *J Immunol* 149:3881-3888.
28. Chan, F. K., H. J. Chun, L. Zheng, R. M. Siegel, K. L. Bui, and M. J. Lenardo. 2000. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 288:2351-2354.
29. Grell, M., F. M. Becke, H. Wajant, D. N. Mannel, and P. Scheurich. 1998. TNF receptor type 2 mediates thymocyte proliferation independently of TNF receptor type 1. *Eur J Immunol* 28:257-263.
30. Ksontini, R., S. L. MacKay, and L. L. Moldawer. 1998. Revisiting the role of tumor necrosis factor alpha and the response to surgical injury and inflammation. *Arch Surg* 133:558-567.
31. Grell, M. 1995. Tumor necrosis factor (TNF) receptors in cellular signaling of soluble and membrane-expressed TNF. *J Inflamm* 47:8-17.
32. Tracey, D., L. Klareskog, E. H. Sasso, J. G. Salfeld, and P. P. Tak. 2008. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 117:244-279.
33. Gommerman, J. L., and J. L. Browning. 2003. Lymphotoxin/light, lymphoid microenvironments and autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 3:642-655.
34. Hehlgans, T., and K. Pfeffer. 2005. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115:1-20.
35. Pasparakis, M., L. Alexopoulou, M. Grell, K. Pfizenmaier, H. Bluethmann, and G. Kollias. 1997. Peyer's patch organogenesis is intact yet formation of B lymphocyte follicles is defective in peripheral lymphoid organs of mice deficient for tumor necrosis factor and its 55-kDa receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:6319-6323.
36. Sedgwick, J. D., D. S. Riminton, J. G. Cyster, and H. Korner. 2000. Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement. *Immunol Today* 21:110-113.

37. Flynn, J. L., M. M. Goldstein, J. Chan, K. J. Triebold, K. Pfeffer, C. J. Lowenstein, R. Schreiber, T. W. Mak, and B. R. Bloom. 1995. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice. *Immunity* 2:561-572.
38. Rothe, J., W. Lesslauer, H. Lotscher, Y. Lang, P. Koebel, F. Kontgen, A. Althage, R. Zinkernagel, M. Steinmetz, and H. Bluethmann. 1993. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by Listeria monocytogenes. *Nature* 364:798-802.
39. Grivennikov, S. I., A. V. Tumanov, D. J. Liepinsh, A. A. Kruglov, B. I. Marakusha, A. N. Shakhov, T. Murakami, L. N. Drutskaya, I. Forster, B. E. Clausen, L. Tessarollo, B. Ryffel, D. V. Kuprash, and S. A. Nedospasov. 2005. Distinct and nonredundant in vivo functions of TNF produced by t cells and macrophages/neutrophils: protective and deleterious effects. *Immunity* 22:93-104.
40. Serbina, N. V., T. P. Salazar-Mather, C. A. Biron, W. A. Kuziel, and E. G. Pamer. 2003. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* 19:59-70.
41. Aversa, G., J. Punnonen, and J. E. de Vries. 1993. The 26-kD transmembrane form of tumor necrosis factor alpha on activated CD4+ T cell clones provides a costimulatory signal for human B cell activation. *J Exp Med* 177:1575-1585.
42. Decker, T., M. L. Lohmann-Matthes, and G. E. Gifford. 1987. Cell-associated tumor necrosis factor (TNF) as a killing mechanism of activated cytotoxic macrophages. *J Immunol* 138:957-962.
43. Eissner, G., S. Kirchner, H. Lindner, W. Kolch, P. Janosch, M. Grell, P. Scheurich, R. Andreesen, and E. Holler. 2000. Reverse signaling through transmembrane TNF confers resistance to lipopolysaccharide in human monocytes and macrophages. *J Immunol* 164:6193-6198.
44. Eissner, G., W. Kolch, and P. Scheurich. 2004. Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. *Cytokine Growth Factor Rev* 15:353-366.
45. Allie, N., L. Alexopoulou, V. J. Quesniaux, L. Fick, K. Kranidioti, G. Kollias, B. Ryffel, and M. Jacobs. 2008. Protective role of membrane tumour necrosis factor in the host's resistance to mycobacterial infection. *Immunology*.
46. Fremond, C., N. Allie, I. Dambuza, S. I. Grivennikov, V. Yeremeev, V. F. Quesniaux, M. Jacobs, and B. Ryffel. 2005. Membrane TNF confers protection to acute mycobacterial infection. *Respir Res* 6:136.
47. Allenbach, C., P. Launois, C. Mueller, and F. Tacchini-Cottier. 2008. An essential role for transmembrane TNF in the resolution of the inflammatory lesion induced by Leishmania major infection. *Eur J Immunol* 38:720-731.
48. Brennan, F. M., D. Chantry, A. Jackson, R. Maini, and M. Feldmann. 1989. Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet* 2:244-247.
49. Keffer, J., L. Probert, H. Cazlaris, S. Georgopoulos, E. Kaslaris, D. Kioussis, and G. Kollias. 1991. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J* 10:4025-4031.
50. Feldmann, M., and R. N. Maini. 2003. Lasker Clinical Medical Research Award. TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Med* 9:1245-1250.
51. Moreira, A. L., E. P. Sampaio, A. Zmuidzinas, P. Frindt, K. A. Smith, and G. Kaplan. 1993. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *J Exp Med* 177:1675-1680.

52. Galustian, C., M. C. Labarthe, J. B. Bartlett, and A. G. Dalgleish. 2004. Thalidomide-derived immunomodulatory drugs as therapeutic agents. *Expert Opin Biol Ther* 4:1963-1970.
53. Scheinfeld, N. 2004. A comprehensive review and evaluation of the side effects of the tumor necrosis factor alpha blockers etanercept, infliximab and adalimumab. *J Dermatolog Treat* 15:280-294.
54. Slifman, N. R., S. K. Gershon, J. H. Lee, E. T. Edwards, and M. M. Braun. 2003. Listeria monocytogenes infection as a complication of treatment with tumor necrosis factor alpha-neutralizing agents. *Arthritis Rheum* 48:319-324.
55. Wallis, R. S., M. S. Broder, J. Y. Wong, M. E. Hanson, and D. O. Beenhouwer. 2004. Granulomatous infectious diseases associated with tumor necrosis factor antagonists. *Clin Infect Dis* 38:1261-1265.
56. Steed, P. M., M. G. Tansey, J. Zalevsky, E. A. Zhukovsky, J. R. Desjarlais, D. E. Szymkowski, C. Abbott, D. Carmichael, C. Chan, L. Cherry, P. Cheung, A. J. Chirino, H. H. Chung, S. K. Doberstein, A. Eivazi, A. V. Filikov, S. X. Gao, R. S. Hubert, M. Hwang, L. Hyun, S. Kashi, A. Kim, E. Kim, J. Kung, S. P. Martinez, U. S. Muchhal, D. H. Nguyen, C. O'Brien, D. O'Keefe, K. Singer, O. Vafa, J. Vielmetter, S. C. Yoder, and B. I. Dahiyat. 2003. Inactivation of TNF signaling by rationally designed dominant-negative TNF variants. *Science* 301:1895-1898.
57. Loetscher, H., D. Stueber, D. Banner, F. Mackay, and W. Lesslauer. 1993. Human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) mutants with exclusive specificity for the 55-kDa or 75-kDa TNF receptors. *J Biol Chem* 268:26350-26357.
58. Metchnikoff, I. 1908. On the present state of the question of immunity in infectious disease.
59. Chen, G., O. Zhuchenko, and A. Kuspa. 2007. Immune-like phagocyte activity in the social amoeba. *Science* 317:678-681.
60. Tepass, U., L. I. Fessler, A. Aziz, and V. Hartenstein. 1994. Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in Drosophila. *Development* 120:1829-1837.
61. Zhou, L., H. Hashimi, L. M. Schwartz, and J. R. Nambu. 1995. Programmed cell death in the Drosophila central nervous system midline. *Curr Biol* 5:784-790.
62. Gordon, S., P. R. Crocker, L. Morris, S. H. Lee, V. H. Perry, and D. A. Hume. 1986. Localization and function of tissue macrophages. *Ciba Found Symp* 118:54-67.
63. Hopkinson-Woolley, J., D. Hughes, S. Gordon, and P. Martin. 1994. Macrophage recruitment during limb development and wound healing in the embryonic and foetal mouse. *J Cell Sci* 107 ( Pt 5):1159-1167.
64. Hoffmann, J. A., F. C. Kafatos, C. A. Janeway, and R. A. Ezekowitz. 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284:1313-1318.
65. Savill, J., N. Hogg, Y. Ren, and C. Haslett. 1992. Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J Clin Invest* 90:1513-1522.
66. Ren, Y., R. L. Silverstein, J. Allen, and J. Savill. 1995. CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *J Exp Med* 181:1857-1862.
67. Platt, N., H. Suzuki, Y. Kurihara, T. Kodama, and S. Gordon. 1996. Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:12456-12460.
68. Platt, N., H. Suzuki, T. Kodama, and S. Gordon. 2000. Apoptotic thymocyte clearance in scavenger receptor class A-deficient mice is apparently normal. *J Immunol* 164:4861-4867.
69. Amiel, E., S. Nicholson-Dykstra, J. J. Walters, H. Higgs, and B. Berwin. 2007. Scavenger receptor-A functions in phagocytosis of E. coli by bone marrow dendritic cells. *Exp Cell Res* 313:1438-1448.

70. Ono, K., C. Nishitani, H. Mitsuzawa, T. Shimizu, H. Sano, H. Suzuki, T. Kodama, N. Fujii, K. Fukase, K. Hirata, and Y. Kuroki. 2006. Mannose-binding lectin augments the uptake of lipid A, Staphylococcus aureus, and Escherichia coli by Kupffer cells through increased cell surface expression of scavenger receptor A. *J Immunol* 177:5517-5523.
71. Helmy, K. Y., K. J. Katschke, Jr., N. N. Gorgani, N. M. Kljavin, J. M. Elliott, L. Diehl, S. J. Scales, N. Ghilardi, and M. van Lookeren Campagne. 2006. CRIg: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. *Cell* 124:915-927.
72. Shi, L., K. Takahashi, J. Dundee, S. Shahroor-Karni, S. Thiel, J. C. Jensenius, F. Gad, M. R. Hamblin, K. N. Sastry, and R. A. Ezekowitz. 2004. Mannose-binding lectin-deficient mice are susceptible to infection with Staphylococcus aureus. *J Exp Med* 199:1379-1390.
73. Cohn, Z. A., and R. M. Steinman. 1982. Phagocytosis and fluid-phase pinocytosis. *Ciba Found Symp*:15-34.
74. Forman, H. J., and M. Torres. 2002. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med* 166:S4-8.
75. Vazquez-Torres, A., J. Jones-Carson, P. Mastroeni, H. Ischiropoulos, and F. C. Fang. 2000. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro. *J Exp Med* 192:227-236.
76. Gantt, K. R., T. L. Goldman, M. L. McCormick, M. A. Miller, S. M. Jeronimo, E. T. Nascimento, B. E. Britigan, and M. E. Wilson. 2001. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of Leishmania chagasi. *J Immunol* 167:893-901.
77. Sansonetti, P. J. 2000. Phagocytosis, a cell biology view. *J Cell Sci* 113 (Pt 19):3355-3356.
78. Lukacs, G. L., O. D. Rotstein, and S. Grinstein. 1991. Determinants of the phagosomal pH in macrophages. In situ assessment of vacuolar H(+)-ATPase activity, counterion conductance, and H+ "leak". *J Biol Chem* 266:24540-24548.
79. Master, S. S., S. K. Rampini, A. S. Davis, C. Keller, S. Ehlers, B. Springer, G. S. Timmins, P. Sander, and V. Deretic. 2008. Mycobacterium tuberculosis prevents inflammasome activation. *Cell Host Microbe* 3:224-232.
80. Walz, T. 2005. How cholesterol-dependent cytolysins bite holes into membranes. *Mol Cell* 18:393-394.
81. Anderson, K. V., L. Bokla, and C. Nusslein-Volhard. 1985. Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 42:791-798.
82. Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, and J. A. Hoffmann. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell* 86:973-983.
83. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway, Jr. 1997. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.
84. Kumagai, Y., O. Takeuchi, and S. Akira. 2008. Pathogen recognition by innate receptors. *J Infect Chemother* 14:86-92.
85. Bowie, A., and L. A. O'Neill. 2000. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol* 67:508-514.
86. Akira, S., and K. Takeda. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4:499-511.

87. Takeuchi, O., K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda, and S. Akira. 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11:443-451.
88. Takeuchi, O., T. Kawai, P. F. Muhlradt, M. Morr, J. D. Radolf, A. Zychlinsky, K. Takeda, and S. Akira. 2001. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 13:933-940.
89. Takeuchi, O., S. Sato, T. Horiuchi, K. Hoshino, K. Takeda, Z. Dong, R. L. Modlin, and S. Akira. 2002. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 169:10-14.
90. Echchannaoui, H., K. Frei, C. Schnell, S. L. Leib, W. Zimmerli, and R. Landmann. 2002. Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to Streptococcus pneumoniae meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. *J Infect Dis* 186:798-806.
91. Takeuchi, O., K. Hoshino, and S. Akira. 2000. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to Staphylococcus aureus infection. *J Immunol* 165:5392-5396.
92. Torres, D., M. Barrier, F. Bihl, V. J. Quesniaux, I. Maillet, S. Akira, B. Ryffel, and F. Erard. 2004. Toll-like receptor 2 is required for optimal control of Listeria monocytogenes infection. *Infect Immun* 72:2131-2139.
93. Netea, M. G., C. A. Van Der Graaf, A. G. Vonk, I. Verschueren, J. W. Van Der Meer, and B. J. Kullberg. 2002. The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis* 185:1483-1489.
94. Fenton, M. J., and D. T. Golenbock. 1998. LPS-binding proteins and receptors. *J Leukoc Biol* 64:25-32.
95. Jack, R. S., X. Fan, M. Bernheiden, G. Rune, M. Ehlers, A. Weber, G. Kirsch, R. Mentel, B. Furll, M. Freudenberg, G. Schmitz, F. Stelter, and C. Schutt. 1997. Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine gram-negative bacterial infection. *Nature* 389:742-745.
96. Shimazu, R., S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome, K. Miyake, and M. Kimoto. 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189:1777-1782.
97. Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill, and A. Aderem. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410:1099-1103.
98. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.
99. Gewirtz, A. T., T. A. Navas, S. Lyons, P. J. Godowski, and J. L. Madara. 2001. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* 167:1882-1885.
100. Maaser, C., J. Heidemann, C. von Eiff, A. Lugering, T. W. Spahn, D. G. Binion, W. Domschke, N. Lugering, and T. Kucharzik. 2004. Human intestinal microvascular endothelial cells express Toll-like receptor 5: a binding partner for bacterial flagellin. *J Immunol* 172:5056-5062.
101. Hawn, T. R., A. Verbon, K. D. Lettinga, L. P. Zhao, S. S. Li, R. J. Laws, S. J. Skerrett, B. Beutler, L. Schroeder, A. Nachman, A. Ozinsky, K. D. Smith, and A. Aderem. 2003. A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *J Exp Med* 198:1563-1572.
102. Yarovinsky, F., D. Zhang, J. F. Andersen, G. L. Bannenberg, C. N. Serhan, M. S. Hayden, S. Hieny, F. S. Sutterwala, R. A. Flavell, S. Ghosh, and A. Sher. 2005. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308:1626-1629.

103. Zhang, D., G. Zhang, M. S. Hayden, M. B. Greenblatt, C. Bussey, R. A. Flavell, and S. Ghosh. 2004. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 303:1522-1526.
104. Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov, and R. A. Flavell. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413:732-738.
105. Hemmi, H., T. Kaisho, O. Takeuchi, S. Sato, H. Sanjo, K. Hoshino, T. Horiuchi, H. Tomizawa, K. Takeda, and S. Akira. 2002. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 3:196-200.
106. Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, and S. Akira. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408:740-745.
107. Suzuki, N., S. Suzuki, G. S. Duncan, D. G. Millar, T. Wada, C. Mirtsos, H. Takada, A. Wakeham, A. Itie, S. Li, J. M. Penninger, H. Wesche, P. S. Ohashi, T. W. Mak, and W. C. Yeh. 2002. Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* 416:750-756.
108. Swantek, J. L., M. F. Tsen, M. H. Cobb, and J. A. Thomas. 2000. IL-1 receptor-associated kinase modulates host responsiveness to endotoxin. *J Immunol* 164:4301-4306.
109. Deng, L., C. Wang, E. Spencer, L. Yang, A. Braun, J. You, C. Slaughter, C. Pickart, and Z. J. Chen. 2000. Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 103:351-361.
110. Sato, S., H. Sanjo, K. Takeda, J. Ninomiya-Tsuji, M. Yamamoto, T. Kawai, K. Matsumoto, O. Takeuchi, and S. Akira. 2005. Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 6:1087-1095.
111. Shim, J. H., C. Xiao, A. E. Paschal, S. T. Bailey, P. Rao, M. S. Hayden, K. Y. Lee, C. Bussey, M. Steckel, N. Tanaka, G. Yamada, S. Akira, K. Matsumoto, and S. Ghosh. 2005. TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes Dev* 19:2668-2681.
112. Karin, M., and Y. Ben-Neriah. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 18:621-663.
113. Yamamoto, M., S. Yamazaki, S. Uematsu, S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Kuwata, O. Takeuchi, K. Takeshige, T. Saitoh, S. Yamaoka, N. Yamamoto, S. Yamamoto, T. Muta, K. Takeda, and S. Akira. 2004. Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein IkappaBzeta. *Nature* 430:218-222.
114. Takaoka, A., H. Yanai, S. Kondo, G. Duncan, H. Negishi, T. Mizutani, S. Kano, K. Honda, Y. Ohba, T. W. Mak, and T. Taniguchi. 2005. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 434:243-249.
115. Horng, T., G. M. Barton, and R. Medzhitov. 2001. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2:835-841.
116. Fitzgerald, K. A., E. M. Palsson-McDermott, A. G. Bowie, C. A. Jefferies, A. S. Mansell, G. Brady, E. Brint, A. Dunne, P. Gray, M. T. Harte, D. McMurray, D. E. Smith, J. E. Sims, T. A. Bird, and L. A. O'Neill. 2001. Mal (MyD88-adapter-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413:78-83.
117. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, H. Sanjo, S. Uematsu, T. Kaisho, K. Hoshino, O. Takeuchi, M. Kobayashi, T. Fujita, K. Takeda, and S. Akira. 2002. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 420:324-329.
118. Kawai, T., and S. Akira. 2007. TLR signaling. *Semin Immunol* 19:24-32.

119. Kaisho, T., O. Takeuchi, T. Kawai, K. Hoshino, and S. Akira. 2001. Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J Immunol* 166:5688-5694.
120. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301:640-643.
121. Hoebe, K., X. Du, P. Georgel, E. Janssen, K. Tabeta, S. O. Kim, J. Goode, P. Lin, N. Mann, S. Mudd, K. Crozat, S. Sovath, J. Han, and B. Beutler. 2003. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* 424:743-748.
122. Fitzgerald, K. A., D. C. Rowe, B. J. Barnes, D. R. Caffrey, A. Visintin, E. Latz, B. Monks, P. M. Pitha, and D. T. Golenbock. 2003. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* 198:1043-1055.
123. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, S. Uematsu, K. Hoshino, T. Kaisho, O. Takeuchi, K. Takeda, and S. Akira. 2003. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 4:1144-1150.
124. Oshiumi, H., M. Sasai, K. Shida, T. Fujita, M. Matsumoto, and T. Seya. 2003. TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem* 278:49751-49762.
125. Ahmad-Nejad, P., H. Hacker, M. Rutz, S. Bauer, R. M. Vabulas, and H. Wagner. 2002. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* 32:1958-1968.
126. Heil, F., P. Ahmad-Nejad, H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, T. Gellert, H. Dietrich, G. Lipford, K. Takeda, S. Akira, H. Wagner, and S. Bauer. 2003. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol* 33:2987-2997.
127. Matsumoto, M., K. Funami, M. Tanabe, H. Oshiumi, M. Shingai, Y. Seto, A. Yamamoto, and T. Seya. 2003. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* 171:3154-3162.
128. Latz, E., A. Visintin, T. Espevik, and D. T. Golenbock. 2004. Mechanisms of TLR9 activation. *J Endotoxin Res* 10:406-412.
129. Underhill, D. M. 2003. Toll-like receptors: networking for success. *Eur J Immunol* 33:1767-1775.
130. Ziegler-Heitbrock, H. W., and R. J. Ulevitch. 1993. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today* 14:121-125.
131. Latz, E., A. Visintin, E. Lien, K. A. Fitzgerald, B. G. Monks, E. A. Kurt-Jones, D. T. Golenbock, and T. Espevik. 2002. Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. *J Biol Chem* 277:47834-47843.
132. Jiang, Z., P. Georgel, X. Du, L. Shamel, S. Sovath, S. Mudd, M. Huber, C. Kalis, S. Keck, C. Galanos, M. Freudenberg, and B. Beutler. 2005. CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nat Immunol* 6:565-570.
133. Godowski, P. J. 2005. A smooth operator for LPS responses. *Nat Immunol* 6:544-546.
134. Schmitz, G., and E. Orso. 2002. CD14 signalling in lipid rafts: new ligands and co-receptors. *Curr Opin Lipidol* 13:513-521.
135. Lentschat, A., H. Karahashi, K. S. Michelsen, L. S. Thomas, W. Zhang, S. N. Vogel, and M. Arditi. 2005. Mastoparan, a G protein agonist peptide, differentially modulates TLR4- and TLR2-mediated signaling in human endothelial cells and murine macrophages. *J Immunol* 174:4252-4261.
136. Finberg, R. W., and E. A. Kurt-Jones. 2006. CD14: chaperone or matchmaker? *Immunity* 24:127-129.

137. Yoshimura, A., E. Lien, R. R. Ingalls, E. Tuomanen, R. Dziarski, and D. Golenbock. 1999. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 163:1-5.
138. Henneke, P., O. Takeuchi, J. A. van Strijp, H. K. Guttormsen, J. A. Smith, A. B. Schromm, T. A. Espevik, S. Akira, V. Nizet, D. L. Kasper, and D. T. Golenbock. 2001. Novel engagement of CD14 and multiple toll-like receptors by group B streptococci. *J Immunol* 167:7069-7076.
139. Compton, T., E. A. Kurt-Jones, K. W. Boehme, J. Belko, E. Latz, D. T. Golenbock, and R. W. Finberg. 2003. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol* 77:4588-4596.
140. Flo, T. H., O. Halaas, E. Lien, L. Ryan, G. Teti, D. T. Golenbock, A. Sundan, and T. Espevik. 2000. Human toll-like receptor 2 mediates monocyte activation by Listeria monocytogenes, but not by group B streptococci or lipopolysaccharide. *J Immunol* 164:2064-2069.
141. Lee, H. K., S. Dunzendorfer, K. Soldau, and P. S. Tobias. 2006. Double-stranded RNA-mediated TLR3 activation is enhanced by CD14. *Immunity* 24:153-163.
142. DeYoung, B. J., and R. W. Innes. 2006. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nat Immunol* 7:1243-1249.
143. Inohara, Chamaillard, C. McDonald, and G. Nunez. 2005. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem* 74:355-383.
144. Martinon, F., and J. Tschopp. 2005. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol* 26:447-454.
145. Kobayashi, K. S., M. Chamaillard, Y. Ogura, O. Henegariu, N. Inohara, G. Nunez, and R. A. Flavell. 2005. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 307:731-734.
146. Chamaillard, M., M. Hashimoto, Y. Horie, J. Masumoto, S. Qiu, L. Saab, Y. Ogura, A. Kawasaki, K. Fukase, S. Kusumoto, M. A. Valvano, S. J. Foster, T. W. Mak, G. Nunez, and N. Inohara. 2003. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol* 4:702-707.
147. Girardin, S. E., I. G. Boneca, J. Viala, M. Chamaillard, A. Labigne, G. Thomas, D. J. Philpott, and P. J. Sansonetti. 2003. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 278:8869-8872.
148. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp. 2002. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 10:417-426.
149. Mariathasan, S., K. Newton, D. M. Monack, D. Vucic, D. M. French, W. P. Lee, M. Roose-Girma, S. Erickson, and V. M. Dixit. 2004. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* 430:213-218.
150. Kanneganti, T. D., N. Ozoren, M. Body-Malapel, A. Amer, J. H. Park, L. Franchi, J. Whitfield, W. Barchet, M. Colonna, P. Vandenabeele, J. Bertin, A. Coyle, E. P. Grant, S. Akira, and G. Nunez. 2006. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* 440:233-236.
151. Mariathasan, S., D. S. Weiss, K. Newton, J. McBride, K. O'Rourke, M. Roose-Girma, W. P. Lee, Y. Weinrauch, D. M. Monack, and V. M. Dixit. 2006. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440:228-232.
152. Martinon, F., V. Petrilli, A. Mayor, A. Tardivel, and J. Tschopp. 2006. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440:237-241.
153. Lightfield, K. L., J. Persson, S. W. Brubaker, C. E. Witte, J. von Moltke, E. A. Dunipace, T. Henry, Y. H. Sun, D. Cado, W. F. Dietrich, D. M. Monack, R. M. Tsolis, and R. E. Vance. 2008. Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin. *Nat Immunol* 9:1171-1178.

154. Yoneyama, M., and T. Fujita. 2007. Function of RIG-I-like receptors in antiviral innate immunity. *J Biol Chem* 282:15315-15318.
155. Hornung, V., J. Ellegast, S. Kim, K. Brzozka, A. Jung, H. Kato, H. Poeck, S. Akira, K. K. Conzelmann, M. Schlee, S. Endres, and G. Hartmann. 2006. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314:994-997.
156. Pichlmair, A., O. Schulz, C. P. Tan, T. I. Naslund, P. Liljestrom, F. Weber, and C. Reis e Sousa. 2006. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 314:997-1001.
157. Kato, H., O. Takeuchi, S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, K. Matsui, S. Uematsu, A. Jung, T. Kawai, K. J. Ishii, O. Yamaguchi, K. Otsu, T. Tsujimura, C. S. Koh, C. Reis e Sousa, Y. Matsuura, T. Fujita, and S. Akira. 2006. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 441:101-105.
158. Berghall, H., J. Siren, D. Sarkar, I. Julkunen, P. B. Fisher, R. Vainionpaa, and S. Matikainen. 2006. The interferon-inducible RNA helicase, mda-5, is involved in measles virus-induced expression of antiviral cytokines. *Microbes Infect* 8:2138-2144.
159. Siren, J., T. Imaizumi, D. Sarkar, T. Pietila, D. L. Noah, R. Lin, J. Hiscott, R. M. Krug, P. B. Fisher, I. Julkunen, and S. Matikainen. 2006. Retinoic acid inducible gene-I and mda-5 are involved in influenza A virus-induced expression of antiviral cytokines. *Microbes Infect* 8:2013-2020.
160. Venkataraman, T., M. Valdes, R. Elsby, S. Kakuta, G. Caceres, S. Saijo, Y. Iwakura, and G. N. Barber. 2007. Loss of DExD/H box RNA helicase LGP2 manifests disparate antiviral responses. *J Immunol* 178:6444-6455.
161. Meylan, E., J. Tschopp, and M. Karin. 2006. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 442:39-44.
162. Murray, E. G. D. W., R A; Swann, M B R. 1926. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leukocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus Bacterium monocytogenes (n. sp.). . *J Pathol Bacteriol.* 29:407–439.
163. Dumont, J. a. C., L. 1921. Bacille semblable à celui du rouget du pors rencontré dans le L.C.R. d'un méningitique. *Ann. Inst. Pasteur* 35:625-633.
164. Watkins, J., and K. P. Sleath. 1981. Isolation and enumeration of Listeria monocytogenes from Sewage, Sewage Sludge and River Water. *J Appl Bacteriol* 50:1-9.
165. Vazquez-Boland, J. A., M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Dominguez-Bernal, W. Goebel, B. Gonzalez-Zorn, J. Wehland, and J. Kreft. 2001. Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* 14:584-640.
166. Wing, E. J., and S. H. Gregory. 2002. Listeria monocytogenes: clinical and experimental update. *J Infect Dis* 185 Suppl 1:S18-24.
167. Aureli, P., G. C. Fiorucci, D. Caroli, G. Marchiaro, O. Novara, L. Leone, and S. Salmaso. 2000. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by Listeria monocytogenes. *N Engl J Med* 342:1236-1241.
168. Dalton, C. B., C. C. Austin, J. Sobel, P. S. Hayes, W. F. Bibb, L. M. Graves, B. Swaminathan, M. E. Proctor, and P. M. Griffin. 1997. An outbreak of gastroenteritis and fever due to Listeria monocytogenes in milk. *N Engl J Med* 336:100-105.
169. Lecuit, M. 2005. Understanding how Listeria monocytogenes targets and crosses host barriers. *Clin Microbiol Infect* 11:430-436.
170. Lecuit, M., D. M. Nelson, S. D. Smith, H. Khun, M. Huerre, M. C. Vacher-Lavenu, J. I. Gordon, and P. Cossart. 2004. Targeting and crossing of the human maternofetal barrier by Listeria monocytogenes: role of internalin interaction with trophoblast E-cadherin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6152-6157.
171. Mylonakis, E., E. L. Hohmann, and S. B. Calderwood. 1998. Central nervous system infection with Listeria monocytogenes. 33 years' experience at a general hospital and review of 776 episodes from the literature. *Medicine (Baltimore)* 77:313-336.

172. Maezawa, Y., A. Hirasawa, T. Abe, H. Kawamura, K. Sekiguchi, M. Kunimoto, T. Sato, Y. Wakabayashi, and T. Nishikawa. 2002. Successful treatment of listerial brain abscess: a case report and literature review. *Intern Med* 41:1073-1078.
173. Nyfelt, A. 1929. Etiologie de la mononucléose infectieuse. *R.C. Soc. Biol.* 101:590-591.
174. Bille, J. 1990. Epidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak, . In A. J. Miller, J. L. Smith, and G. A. Somkuti (ed.), Food-borne listeriosis. *Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.*:71-74.
175. Fleming, D. W., S. L. Cochi, K. L. MacDonald, J. Brondum, P. S. Hayes, B. D. Plikaytis, M. B. Holmes, A. Audurier, C. V. Broome, and A. L. Reingold. 1985. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *N Engl J Med* 312:404-407.
176. Linnan, M. J., L. Mascola, X. D. Lou, V. Goulet, S. May, C. Salminen, D. W. Hird, M. L. Yonekura, P. Hayes, R. Weaver, and et al. 1988. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *N Engl J Med* 319:823-828.
177. Goulet, V., H. de Valk, O. Pierre, F. Stainer, J. Rocourt, V. Vaillant, C. Jacquet, and J. C. Desenclos. 2001. Effect of prevention measures on incidence of human listeriosis, France, 1987-1997. *Emerg Infect Dis* 7:983-989.
178. Lecuit, M. 2007. Human listeriosis and animal models. *Microbes Infect* 9:1216-1225.
179. Karunasagar, I., B. Senghaas, G. Krohne, and W. Goebel. 1994. Ultrastructural study of Listeria monocytogenes entry into cultured human colonic epithelial cells. *Infect Immun* 62:3554-3558.
180. Pron, B., C. Boumaila, F. Jaubert, S. Sarnacki, J. P. Monnet, P. Berche, and J. L. Gaillard. 1998. Comprehensive study of the intestinal stage of listeriosis in a rat ligated ileal loop system. *Infect Immun* 66:747-755.
181. Marco, A. J., J. Altimira, N. Prats, S. Lopez, L. Dominguez, M. Domingo, and V. Briones. 1997. Penetration of Listeria monocytogenes in mice infected by the oral route. *Microb Pathog* 23:255-263.
182. Pron, B., C. Boumaila, F. Jaubert, P. Berche, G. Milon, F. Geissmann, and J. L. Gaillard. 2001. Dendritic cells are early cellular targets of Listeria monocytogenes after intestinal delivery and are involved in bacterial spread in the host. *Cell Microbiol* 3:331-340.
183. Marco, A. J., N. Prats, J. A. Ramos, V. Briones, M. Blanco, L. Dominguez, and M. Domingo. 1992. A microbiological, histopathological and immunohistological study of the intragastric inoculation of Listeria monocytogenes in mice. *J Comp Pathol* 107:1-9.
184. Cousens, L. P., and E. J. Wing. 2000. Innate defenses in the liver during Listeria infection. *Immunol Rev* 174:150-159.
185. Ebe, Y., G. Hasegawa, H. Takatsuka, H. Umezu, M. Mitsuyama, M. Arakawa, N. Mukaida, and M. Naito. 1999. The role of Kupffer cells and regulation of neutrophil migration into the liver by macrophage inflammatory protein-2 in primary listeriosis in mice. *Pathol Int* 49:519-532.
186. Gaillard, J. L., F. Jaubert, and P. Berche. 1996. The inlAB locus mediates the entry of Listeria monocytogenes into hepatocytes in vivo. *J Exp Med* 183:359-369.
187. Conlan, J. W., and R. J. North. 1992. Early pathogenesis of infection in the liver with the facultative intracellular bacteria Listeria monocytogenes, Francisella tularensis, and Salmonella typhimurium involves lysis of infected hepatocytes by leukocytes. *Infect Immun* 60:5164-5171.
188. Guzman, C. A., M. Rohde, T. Chakraborty, E. Domann, M. Hudel, J. Wehland, and K. N. Timmis. 1995. Interaction of Listeria monocytogenes with mouse dendritic cells. *Infect Immun* 63:3665-3673.
189. Campbell, P. A. 1994. Macrophage-Listeria interactions. *Immunol Ser* 60:313-328.

190. Drevets, D. A., and P. A. Campbell. 1991. Roles of complement and complement receptor type 3 in phagocytosis of Listeria monocytogenes by inflammatory mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun* 59:2645-2652.
191. Drevets, D. A., R. T. Sawyer, T. A. Potter, and P. A. Campbell. 1995. Listeria monocytogenes infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. *Infect Immun* 63:4268-4276.
192. Gaillard, J. L., P. Berche, J. Mounier, S. Richard, and P. Sansonetti. 1987. In vitro model of penetration and intracellular growth of Listeria monocytogenes in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect Immun* 55:2822-2829.
193. Tilney, L. G., and D. A. Portnoy. 1989. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, Listeria monocytogenes. *J Cell Biol* 109:1597-1608.
194. Dabiri, G. A., J. M. Sanger, D. A. Portnoy, and F. S. Southwick. 1990. Listeria monocytogenes moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6068-6072.
195. Cossart, P., and M. Lecuit. 1998. Interactions of Listeria monocytogenes with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *EMBO J* 17:3797-3806.
196. Cossart, P., and A. Toledo-Arana. 2008. Listeria monocytogenes, a unique model in infection biology: an overview. *Microbes Infect* 10:1041-1050.
197. Lecuit, M., H. Ohayon, L. Braun, J. Mengaud, and P. Cossart. 1997. Internalin of Listeria monocytogenes with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infect Immun* 65:5309-5319.
198. Braun, L., H. Ohayon, and P. Cossart. 1998. The InIB protein of Listeria monocytogenes is sufficient to promote entry into mammalian cells. *Mol Microbiol* 27:1077-1087.
199. Disson, O., S. Grayo, E. Huillet, G. Nikitas, F. Langa-Vives, O. Dussurget, M. Ragon, A. Le Monnier, C. Babinet, P. Cossart, and M. Lecuit. 2008. Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis. *Nature* 455:1114-1118.
200. Mengaud, J., H. Ohayon, P. Gounon, R. M. Mege, and P. Cossart. 1996. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of L. monocytogenes into epithelial cells. *Cell* 84:923-932.
201. Adams, C. L., and W. J. Nelson. 1998. Cytomechanics of cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 10:572-577.
202. Lecuit, M., R. Hurme, J. Pizarro-Cerda, H. Ohayon, B. Geiger, and P. Cossart. 2000. A role for alpha-and beta-catenins in bacterial uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10008-10013.
203. Kovacs, E. M., M. Goodwin, R. G. Ali, A. D. Paterson, and A. S. Yap. 2002. Cadherin-directed actin assembly: E-cadherin physically associates with the Arp2/3 complex to direct actin assembly in nascent adhesive contacts. *Curr Biol* 12:379-382.
204. Hamon, M., H. Bierne, and P. Cossart. 2006. Listeria monocytogenes: a multifaceted model. *Nat Rev Microbiol* 4:423-434.
205. Lecuit, M., S. Dramsi, C. Gottardi, M. Fedor-Chaiken, B. Gumbiner, and P. Cossart. 1999. A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen Listeria monocytogenes. *EMBO J* 18:3956-3963.
206. Wollert, T., B. Pasche, M. Rochon, S. Deppenmeier, J. van den Heuvel, A. D. Gruber, D. W. Heinz, A. Lengeling, and W. D. Schubert. 2007. Extending the host range of Listeria monocytogenes by rational protein design. *Cell* 129:891-902.
207. Jonquieres, R., H. Bierne, F. Fiedler, P. Gounon, and P. Cossart. 1999. Interaction between the protein InlB of Listeria monocytogenes and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 34:902-914.

208. Braun, L., B. Ghebrehiwet, and P. Cossart. 2000. gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of Listeria monocytogenes. *EMBO J* 19:1458-1466.
209. Peerschke, E. I., and B. Ghebrehiwet. 2001. Human blood platelet gC1qR/p33. *Immunol Rev* 180:56-64.
210. Shen, Y., M. Naujokas, M. Park, and K. Ireton. 2000. InIB-dependent internalization of Listeria is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* 103:501-510.
211. Ireton, K., B. Payrastre, and P. Cossart. 1999. The Listeria monocytogenes protein InlB is an agonist of mammalian phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 274:17025-17032.
212. Jonquieres, R., J. Pizarro-Cerda, and P. Cossart. 2001. Synergy between the N- and C-terminal domains of InlB for efficient invasion of non-phagocytic cells by Listeria monocytogenes. *Mol Microbiol* 42:955-965.
213. Veiga, E., J. A. Guttman, M. Bonazzi, E. Boucrot, A. Toledo-Arana, A. E. Lin, J. Enninga, J. Pizarro-Cerda, B. B. Finlay, T. Kirchhausen, and P. Cossart. 2007. Invasive and adherent bacterial pathogens co-Opt host clathrin for infection. *Cell Host Microbe* 2:340-351.
214. Tweten, R. K. 2005. Cholesterol-dependent cytolysins, a family of versatile pore-forming toxins. *Infect Immun* 73:6199-6209.
215. Kocks, C., E. Gouin, M. Tabouret, P. Berche, H. Ohayon, and P. Cossart. 1992. L. monocytogenes-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell* 68:521-531.
216. Domann, E., J. Wehland, M. Rohde, S. Pistor, M. Hartl, W. Goebel, M. Leimeister-Wachter, M. Wuenscher, and T. Chakraborty. 1992. A novel bacterial virulence gene in Listeria monocytogenes required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *EMBO J* 11:1981-1990.
217. Machesky, L. M., R. D. Mullins, H. N. Higgs, D. A. Kaiser, L. Blanchoin, R. C. May, M. E. Hall, and T. D. Pollard. 1999. Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3739-3744.
218. Geese, M., J. J. Loureiro, J. E. Bear, J. Wehland, F. B. Gertler, and A. S. Sechi. 2002. Contribution of Ena/VASP proteins to intracellular motility of listeria requires phosphorylation and proline-rich core but not F-actin binding or multimerization. *Mol Biol Cell* 13:2383-2396.
219. Conlan, J. W. 1996. Early pathogenesis of Listeria monocytogenes infection in the mouse spleen. *J Med Microbiol* 44:295-302.
220. Rogers, H. W., and E. R. Unanue. 1993. Neutrophils are involved in acute, nonspecific resistance to Listeria monocytogenes in mice. *Infect Immun* 61:5090-5096.
221. Czuprynski, C. J., J. F. Brown, N. Maroushek, R. D. Wagner, and H. Steinberg. 1994. Administration of anti-granulocyte mAb RB6-8C5 impairs the resistance of mice to Listeria monocytogenes infection. *J Immunol* 152:1836-1846.
222. Conlan, J. W., and R. J. North. 1994. Neutrophils are essential for early anti-Listeria defense in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by a granulocyte-depleting monoclonal antibody. *J Exp Med* 179:259-268.
223. Guleria, I., and J. W. Pollard. 2001. Aberrant macrophage and neutrophil population dynamics and impaired Th1 response to Listeria monocytogenes in colony-stimulating factor 1-deficient mice. *Infect Immun* 69:1795-1807.
224. Kurihara, T., G. Warr, J. Loy, and R. Bravo. 1997. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J Exp Med* 186:1757-1762.
225. Havell, E. A. 1987. Production of tumor necrosis factor during murine listeriosis. *J Immunol* 139:4225-4231.

226. Tripp, C. S., S. F. Wolf, and E. R. Unanue. 1993. Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3725-3729.
227. Pfeffer, K., T. Matsuyama, T. M. Kundig, A. Wakeham, K. Kishihara, A. Shahinian, K. Wiegmann, P. S. Ohashi, M. Kronke, and T. W. Mak. 1993. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection. *Cell* 73:457-467.
228. Harty, J. T., and M. J. Bevan. 1995. Specific immunity to Listeria monocytogenes in the absence of IFN gamma. *Immunity* 3:109-117.
229. MacMicking, J. D., C. Nathan, G. Hom, N. Chartrain, D. S. Fletcher, M. Trumbauer, K. Stevens, Q. W. Xie, K. Sokol, N. Hutchinson, and et al. 1995. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell* 81:641-650.
230. Shiloh, M. U., J. D. MacMicking, S. Nicholson, J. E. Brause, S. Potter, M. Marino, F. Fang, M. Dinauer, and C. Nathan. 1999. Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. *Immunity* 10:29-38.
231. Hiromatsu, K., Y. Yoshikai, G. Matsuzaki, S. Ohga, K. Muramori, K. Matsumoto, J. A. Bluestone, and K. Nomoto. 1992. A protective role of gamma/delta T cells in primary infection with Listeria monocytogenes in mice. *J Exp Med* 175:49-56.
232. Huang, S., W. Hendriks, A. Althage, S. Hemmi, H. Bluethmann, R. Kamijo, J. Vilcek, R. M. Zinkernagel, and M. Aguet. 1993. Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science* 259:1742-1745.
233. Nakane, A., and T. Minagawa. 1984. The significance of alpha/beta interferons and gamma interferon produced in mice infected with Listeria monocytogenes. *Cell Immunol* 88:29-40.
234. Havell, E. A. 1986. Augmented induction of interferons during Listeria monocytogenes infection. *J Infect Dis* 153:960-969.
235. Decker, T., M. Muller, and S. Stockinger. 2005. The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection. *Nat Rev Immunol* 5:675-687.
236. Carrero, J. A., B. Calderon, and E. R. Unanue. 2004. Type I interferon sensitizes lymphocytes to apoptosis and reduces resistance to Listeria infection. *J Exp Med* 200:535-540.
237. O'Connell, R. M., S. K. Saha, S. A. Vaidya, K. W. Bruhn, G. A. Miranda, B. Zarnegar, A. K. Perry, B. O. Nguyen, T. F. Lane, T. Taniguchi, J. F. Miller, and G. Cheng. 2004. Type I interferon production enhances susceptibility to Listeria monocytogenes infection. *J Exp Med* 200:437-445.
238. Auerbuch, V., D. G. Brockstedt, N. Meyer-Morse, M. O'Riordan, and D. A. Portnoy. 2004. Mice lacking the type I interferon receptor are resistant to Listeria monocytogenes. *J Exp Med* 200:527-533.
239. O'Riordan, M., C. H. Yi, R. Gonzales, K. D. Lee, and D. A. Portnoy. 2002. Innate recognition of bacteria by a macrophage cytosolic surveillance pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13861-13866.
240. McCaffrey, R. L., P. Fawcett, M. O'Riordan, K. D. Lee, E. A. Havell, P. O. Brown, and D. A. Portnoy. 2004. A specific gene expression program triggered by Gram-positive bacteria in the cytosol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11386-11391.
241. Seki, E., H. Tsutsui, N. M. Tsuji, N. Hayashi, K. Adachi, H. Nakano, S. Futatsugi-Yumikura, O. Takeuchi, K. Hoshino, S. Akira, J. Fujimoto, and K. Nakanishi. 2002. Critical roles of myeloid differentiation factor 88-dependent proinflammatory cytokine release in early phase clearance of Listeria monocytogenes in mice. *J Immunol* 169:3863-3868.

242. Edelson, B. T., and E. R. Unanue. 2002. MyD88-dependent but Toll-like receptor 2-independent innate immunity to Listeria: no role for either in macrophage listericidal activity. *J Immunol* 169:3869-3875.
243. Way, S. S., T. R. Kollmann, A. M. Hajjar, and C. B. Wilson. 2003. Cutting edge: protective cell-mediated immunity to Listeria monocytogenes in the absence of myeloid differentiation factor 88. *J Immunol* 171:533-537.
244. Way, S. S., L. J. Thompson, J. E. Lopes, A. M. Hajjar, T. R. Kollmann, N. E. Freitag, and C. B. Wilson. 2004. Characterization of flagellin expression and its role in Listeria monocytogenes infection and immunity. *Cell Microbiol* 6:235-242.
245. Muraille, E., R. Giannino, P. Guirnalda, I. Leiner, S. Jung, E. G. Pamer, and G. Lauvau. 2005. Distinct in vivo dendritic cell activation by live versus killed Listeria monocytogenes. *Eur J Immunol* 35:1463-1471.
246. Brzoza, K. L., A. B. Rockel, and E. M. Hiltbold. 2004. Cytoplasmic entry of Listeria monocytogenes enhances dendritic cell maturation and T cell differentiation and function. *J Immunol* 173:2641-2651.
247. Soulat, D., A. Bauch, S. Stockinger, G. Superti-Furga, and T. Decker. 2006. Cytoplasmic Listeria monocytogenes stimulates IFN-beta synthesis without requiring the adapter protein MAVS. *FEBS Lett* 580:2341-2346.
248. Sun, Q., L. Sun, H. H. Liu, X. Chen, R. B. Seth, J. Forman, and Z. J. Chen. 2006. The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses. *Immunity* 24:633-642.
249. Janeway, C. A., Jr., and R. Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216.
250. Nickol, A. D., and P. F. Bonventre. 1977. Anomalous high native resistance to athymic mice to bacterial pathogens. *Infect Immun* 18:636-645.
251. Bancroft, G. J., R. D. Schreiber, and E. R. Unanue. 1991. Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse. *Immunol Rev* 124:5-24.
252. Bhardwaj, V., O. Kanagawa, P. E. Swanson, and E. R. Unanue. 1998. Chronic Listeria infection in SCID mice: requirements for the carrier state and the dual role of T cells in transferring protection or suppression. *J Immunol* 160:376-384.
253. Guermonprez, P., L. Saveanu, M. Kleijmeer, J. Davoust, P. Van Endert, and S. Amigorena. 2003. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425:397-402.
254. Finelli, A., K. M. Kerksiek, S. E. Allen, N. Marshall, R. Mercado, I. Pilip, D. H. Busch, and E. G. Pamer. 1999. MHC class I restricted T cell responses to Listeria monocytogenes, an intracellular bacterial pathogen. *Immunol Res* 19:211-223.
255. Heath, W. R., and F. R. Carbone. 2001. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 19:47-64.
256. Villanueva, M. S., A. J. Sijts, and E. G. Pamer. 1995. Listeriolysin is processed efficiently into an MHC class I-associated epitope in Listeria monocytogenes-infected cells. *J Immunol* 155:5227-5233.
257. Vijh, S., I. M. Pilip, and E. G. Pamer. 1998. Effect of antigen-processing efficiency on in vivo T cell response magnitudes. *J Immunol* 160:3971-3977.
258. Wong, P., and E. G. Pamer. 2001. Cutting edge: antigen-independent CD8 T cell proliferation. *J Immunol* 166:5864-5868.
259. Busch, D. H., I. M. Pilip, S. Vijh, and E. G. Pamer. 1998. Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection. *Immunity* 8:353-362.
260. Harty, J. T., and V. P. Badovinac. 2002. Influence of effector molecules on the CD8(+) T cell response to infection. *Curr Opin Immunol* 14:360-365.

261. Kagi, D., B. Ledermann, K. Burki, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 1994. CD8+ T cell-mediated protection against an intracellular bacterium by perforin-dependent cytotoxicity. *Eur J Immunol* 24:3068-3072.
262. San Mateo, L. R., M. M. Chua, S. R. Weiss, and H. Shen. 2002. Perforin-mediated CTL cytolysis counteracts direct cell-cell spread of Listeria monocytogenes. *J Immunol* 169:5202-5208.
263. Daugelat, S., C. H. Ladel, B. Schoel, and S. H. Kaufmann. 1994. Antigen-specific T-cell responses during primary and secondary Listeria monocytogenes infection. *Infect Immun* 62:1881-1888.
264. Shedlock, D. J., J. K. Whitmire, J. Tan, A. S. MacDonald, R. Ahmed, and H. Shen. 2003. Role of CD4 T cell help and costimulation in CD8 T cell responses during Listeria monocytogenes infection. *J Immunol* 170:2053-2063.
265. Sun, J. C., and M. J. Bevan. 2003. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 300:339-342.
266. Sun, J. C., M. A. Williams, and M. J. Bevan. 2004. CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection. *Nat Immunol* 5:927-933.
267. Busch, D. H., K. M. Kerksiek, and E. G. Pamer. 2000. Differing roles of inflammation and antigen in T cell proliferation and memory generation. *J Immunol* 164:4063-4070.
268. Wong, P., M. Lara-Tejero, A. Ploss, I. Leiner, and E. G. Pamer. 2004. Rapid development of T cell memory. *J Immunol* 172:7239-7245.
269. Ahmed, R., and D. Gray. 1996. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272:54-60.
270. Busch, D. H., I. Pilip, and E. G. Pamer. 1998. Evolution of a complex T cell receptor repertoire during primary and recall bacterial infection. *J Exp Med* 188:61-70.
271. Busch, D. H., and E. G. Pamer. 1999. T cell affinity maturation by selective expansion during infection. *J Exp Med* 189:701-710.
272. Kursar, M., K. Bonhagen, J. Fensterle, A. Kohler, R. Hurwitz, T. Kamradt, S. H. Kaufmann, and H. W. Mittrucker. 2002. Regulatory CD4+CD25+ T cells restrict memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med* 196:1585-1592.
273. Kursar, M., A. Kohler, S. H. Kaufmann, and H. W. Mittrucker. 2004. Depletion of CD4+ T cells during immunization with nonviable Listeria monocytogenes causes enhanced CD8+ T cell-mediated protection against listeriosis. *J Immunol* 172:3167-3172.
274. Edelson, B. T., and E. R. Unanue. 2001. Intracellular antibody neutralizes Listeria growth. *Immunity* 14:503-512.
275. Ochsenbein, A. F., T. Fehr, C. Lutz, M. Suter, F. Brombacher, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 1999. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* 286:2156-2159.
276. Shen, H., J. K. Whitmire, X. Fan, D. J. Shedlock, S. M. Kaech, and R. Ahmed. 2003. A specific role for B cells in the generation of CD8 T cell memory by recombinant Listeria monocytogenes. *J Immunol* 170:1443-1451.
277. Coonrod, J. D. 1986. The role of extracellular bactericidal factors in pulmonary host defense. *Semin Respir Infect* 1:118-129.
278. Hiratsuka, T., M. Nakazato, Y. Date, J. Ashitani, T. Minematsu, N. Chino, and S. Matsukura. 1998. Identification of human beta-defensin-2 in respiratory tract and plasma and its increase in bacterial pneumonia. *Biochem Biophys Res Commun* 249:943-947.
279. Ganz, T., M. E. Selsted, D. Szklarek, S. S. Harwig, K. Daher, D. F. Bainton, and R. I. Lehrer. 1985. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* 76:1427-1435.

280. Selsted, M. E., S. S. Harwig, T. Ganz, J. W. Schilling, and R. I. Lehrer. 1985. Primary structures of three human neutrophil defensins. *J Clin Invest* 76:1436-1439.
281. Tang, Y. Q., J. Yuan, G. Osapay, K. Osapay, D. Tran, C. J. Miller, A. J. Ouellette, and M. E. Selsted. 1999. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science* 286:498-502.
282. Ganz, T. 1987. Extracellular release of antimicrobial defensins by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 55:568-571.
283. Rice, W. G., T. Ganz, J. M. Kinkade, Jr., M. E. Selsted, R. I. Lehrer, and R. T. Parmley. 1987. Defensin-rich dense granules of human neutrophils. *Blood* 70:757-765.
284. Ganz, T., and R. I. Lehrer. 1995. Defensins. *Pharmacol Ther* 66:191-205.
285. Goldman, M. J., G. M. Anderson, E. D. Stolzenberg, U. P. Kari, M. Zasloff, and J. M. Wilson. 1997. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 88:553-560.
286. Wimley, W. C., M. E. Selsted, and S. H. White. 1994. Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci* 3:1362-1373.
287. Lehrer, R. I., A. Barton, K. A. Daher, S. S. Harwig, T. Ganz, and M. E. Selsted. 1989. Interaction of human defensins with Escherichia coli. Mechanism of bactericidal activity. *J Clin Invest* 84:553-561.
288. Lehrer, R. I., T. Ganz, D. Szklarek, and M. E. Selsted. 1988. Modulation of the in vitro candidacidal activity of human neutrophil defensins by target cell metabolism and divalent cations. *J Clin Invest* 81:1829-1835.
289. Selsted, M. E., D. Szklarek, T. Ganz, and R. I. Lehrer. 1985. Activity of rabbit leukocyte peptides against Candida albicans. *Infect Immun* 49:202-206.
290. Verkman, A. S., Y. Song, and J. R. Thiagarajah. 2003. Role of airway surface liquid and submucosal glands in cystic fibrosis lung disease. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C2-15.
291. Wine, J. J. 1999. The genesis of cystic fibrosis lung disease. *J Clin Invest* 103:309-312.
292. Smith, J. J., S. M. Travis, E. P. Greenberg, and M. J. Welsh. 1996. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* 85:229-236.
293. Territo, M. C., T. Ganz, M. E. Selsted, and R. Lehrer. 1989. Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. *J Clin Invest* 84:2017-2020.
294. Chertov, O., D. F. Michiel, L. Xu, J. M. Wang, K. Tani, W. J. Murphy, D. L. Longo, D. D. Taub, and J. J. Oppenheim. 1996. Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J Biol Chem* 271:2935-2940.
295. Yang, D., O. Chertov, S. N. Bykovskaia, Q. Chen, M. J. Buffo, J. Shogan, M. Anderson, J. M. Schroder, J. M. Wang, O. M. Howard, and J. J. Oppenheim. 1999. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 286:525-528.
296. Yang, D., Q. Chen, O. Chertov, and J. J. Oppenheim. 2000. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J Leukoc Biol* 68:9-14.
297. White, R. T., D. Damm, J. Miller, K. Spratt, J. Schilling, S. Hawgood, B. Benson, and B. Cordell. 1985. Isolation and characterization of the human pulmonary surfactant apoprotein gene. *Nature* 317:361-363.
298. Benson, B., S. Hawgood, J. Schilling, J. Clements, D. Damm, B. Cordell, and R. T. White. 1985. Structure of canine pulmonary surfactant apoprotein: cDNA and complete amino acid sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:6379-6383.

299. Haagsman, H. P., S. Hawgood, T. Sargeant, D. Buckley, R. T. White, K. Drickamer, and B. J. Benson. 1987. The major lung surfactant protein, SP 28-36, is a calcium-dependent, carbohydrate-binding protein. *J Biol Chem* 262:13877-13880.
300. Drickamer, K., and V. McCreary. 1987. Exon structure of a mannose-binding protein gene reflects its evolutionary relationship to the asialoglycoprotein receptor and nonfibrillar collagens. *J Biol Chem* 262:2582-2589.
301. Holmskov, U., S. B. Laursen, R. Malhotra, H. Wiedemann, R. Timpl, G. R. Stuart, I. Tornoe, P. S. Madsen, K. B. Reid, and J. C. Jensenius. 1995. Comparative study of the structural and functional properties of a bovine plasma C-type lectin, collectin-43, with other collectins. *Biochem J* 305 ( Pt 3):889-896.
302. Hartshorn, K. L., U. Holmskov, S. Hansen, P. Zhang, J. Meschi, T. Mogues, M. R. White, and E. C. Crouch. 2002. Distinctive anti-influenza properties of recombinant collectin 43. *Biochem J* 366:87-96.
303. Van Rozendaal, B. A., C. H. Van de Lest, M. Van Eijk, H. P. Van Helden, and H. P. Haagsman. 1997. Pulmonary surfactant proteins A and D are involved in the early response to intratracheally aerosolized lipopolysaccharide. *Biochem Soc Trans* 25:S656.
304. Sahly, H., I. Ofek, R. Podschun, H. Brade, Y. He, U. Ullmann, and E. Crouch. 2002. Surfactant protein D binds selectively to Klebsiella pneumoniae lipopolysaccharides containing mannose-rich O-antigens. *J Immunol* 169:3267-3274.
305. Saitoh, M., H. Sano, H. Chiba, S. Murakami, D. Iwaki, H. Sohma, D. R. Voelker, T. Akino, and Y. Kuroki. 2000. Importance of the carboxy-terminal 25 amino acid residues of lung collectins in interactions with lipids and alveolar type II cells. *Biochemistry* 39:1059-1066.
306. Palaniyar, N., J. Nadesalingam, and K. B. Reid. 2003. Innate immune collectins bind nucleic acids and enhance DNA clearance in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 1010:467-470.
307. Palaniyar, N., H. Clark, J. Nadesalingam, S. Hawgood, and K. B. Reid. 2003. Surfactant protein D binds genomic DNA and apoptotic cells, and enhances their clearance, in vivo. *Ann N Y Acad Sci* 1010:471-475.
308. Malhotra, R., S. Thiel, K. B. Reid, and R. B. Sim. 1990. Human leukocyte C1q receptor binds other soluble proteins with collagen domains. *J Exp Med* 172:955-959.
309. Lu, J. H., S. Thiel, H. Wiedemann, R. Timpl, and K. B. Reid. 1990. Binding of the pentamer/hexamer forms of mannan-binding protein to zymosan activates the proenzyme C1r2C1s2 complex, of the classical pathway of complement, without involvement of C1q. *J Immunol* 144:2287-2294.
310. Fraser, D. A., and A. J. Tenner. 2008. Directing an appropriate immune response: the role of defense collagens and other soluble pattern recognition molecules. *Curr Drug Targets* 9:113-122.
311. Fujita, T. 2002. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2:346-353.
312. MacLean, J. A., W. Xia, C. E. Pinto, L. Zhao, H. W. Liu, and R. L. Kradin. 1996. Sequestration of inhaled particulate antigens by lung phagocytes. A mechanism for the effective inhibition of pulmonary cell-mediated immunity. *Am J Pathol* 148:657-666.
313. Holt, P. G. 1978. Inhibitory activity of unstimulated alveolar macrophages on T-lymphocyte blastogenic response. *Am Rev Respir Dis* 118:791-793.
314. Thepen, T., N. Van Rooijen, and G. Kraal. 1989. Alveolar macrophage elimination in vivo is associated with an increase in pulmonary immune response in mice. *J Exp Med* 170:499-509.
315. Holt, P. G., J. Oliver, N. Bilyk, C. McMenamin, P. G. McMenamin, G. Kraal, and T. Thepen. 1993. Downregulation of the antigen presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages. *J Exp Med* 177:397-407.

316. Morris, D. G., X. Huang, N. Kaminski, Y. Wang, S. D. Shapiro, G. Dolganov, A. Glick, and D. Sheppard. 2003. Loss of integrin alpha(v)beta6-mediated TGF-beta activation causes Mmp12-dependent emphysema. *Nature* 422:169-173.
317. Takabayshi, K., M. Corr, T. Hayashi, V. Redecke, L. Beck, D. Guiney, D. Sheppard, and E. Raz. 2006. Induction of a homeostatic circuit in lung tissue by microbial compounds. *Immunity* 24:475-487.
318. Lambrecht, B. N. 2006. Alveolar macrophage in the driver's seat. *Immunity* 24:366-368.
319. Nelson, D. J., C. McMenamin, A. S. McWilliam, M. Brenan, and P. G. Holt. 1994. Development of the airway intraepithelial dendritic cell network in the rat from class II major histocompatibility (Ia)-negative precursors: differential regulation of Ia expression at different levels of the respiratory tract. *J Exp Med* 179:203-212.
320. Jahnsen, F. L., E. D. Moloney, T. Hogan, J. W. Upham, C. M. Burke, and P. G. Holt. 2001. Rapid dendritic cell recruitment to the bronchial mucosa of patients with atopic asthma in response to local allergen challenge. *Thorax* 56:823-826.
321. Jahnsen, F. L., D. H. Strickland, J. A. Thomas, I. T. Tobagus, S. Napoli, G. R. Zosky, D. J. Turner, P. D. Sly, P. A. Stumbles, and P. G. Holt. 2006. Accelerated antigen sampling and transport by airway mucosal dendritic cells following inhalation of a bacterial stimulus. *J Immunol* 177:5861-5867.
322. 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.
323. Strickland, D., U. R. Kees, and P. G. Holt. 1996. Regulation of T-cell activation in the lung: isolated lung T cells exhibit surface phenotypic characteristics of recent activation including down-modulated T-cell receptors, but are locked into the G0/G1 phase of the cell cycle. *Immunology* 87:242-249.
324. Hintzen, G., L. Ohl, M. L. del Rio, J. I. Rodriguez-Barbosa, O. Pabst, J. R. Kocks, J. Krege, S. Hardtke, and R. Forster. 2006. Induction of tolerance to innocuous inhaled antigen relies on a CCR7-dependent dendritic cell-mediated antigen transport to the bronchial lymph node. *J Immunol* 177:7346-7354.
325. Sibille, Y., and H. Y. Reynolds. 1990. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am Rev Respir Dis* 141:471-501.
326. Lehrer, R. I., T. Ganz, M. E. Selsted, B. M. Babior, and J. T. Curnutte. 1988. Neutrophils and host defense. *Ann Intern Med* 109:127-142.
327. Cohen, A. B., and M. Rossi. 1983. Neutrophils in normal lungs. *Am Rev Respir Dis* 127:S3-9.
328. Nelson, S., C. M. Mason, J. Kolls, and W. R. Summer. 1995. Pathophysiology of pneumonia. *Clin Chest Med* 16:1-12.
329. Nelson, S., G. J. Bagby, B. G. Bainton, L. A. Wilson, J. J. Thompson, and W. R. Summer. 1989. Compartmentalization of intraalveolar and systemic lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor and the pulmonary inflammatory response. *J Infect Dis* 159:189-194.
330. Zhang, P., G. J. Bagby, D. A. Stoltz, J. A. Spitzer, W. R. Summer, and S. Nelson. 1997. Modulation of the lung host response by granulocyte colony-stimulating factor in rats challenged with intrapulmonary endotoxin. *Shock* 7:193-199.
331. Xing, Z., M. Jordana, H. Kirpalani, K. E. Driscoll, T. J. Schall, and J. Gauldie. 1994. Cytokine expression by neutrophils and macrophages in vivo: endotoxin induces tumor necrosis factor-alpha, macrophage inflammatory protein-2, interleukin-1 beta, and interleukin-6 but not RANTES or transforming growth factor-beta 1 mRNA expression in acute lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10:148-153.

332. Chevance, F. F., and K. T. Hughes. 2008. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat Rev Microbiol* 6:455-465.
333. Blocker, A., K. Komoriya, and S. Aizawa. 2003. Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3027-3030.
334. Galan, J. E., and H. Wolf-Watz. 2006. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* 444:567-573.
335. Hueck, C. J. 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:379-433.
336. Winstanley, C., and J. A. Morgan. 1997. The bacterial flagellin gene as a biomarker for detection, population genetics and epidemiological analysis. *Microbiology* 143 ( Pt 10):3071-3084.
337. Donnelly, M. A., and T. S. Steiner. 2002. Two nonadjacent regions in enteroaggregative Escherichia coli flagellin are required for activation of toll-like receptor 5. *J Biol Chem* 277:40456-40461.
338. Eaves-Pyles, T. D., H. R. Wong, K. Odoms, and R. B. Pyles. 2001. Salmonella flagellin-dependent proinflammatory responses are localized to the conserved amino and carboxyl regions of the protein. *J Immunol* 167:7009-7016.
339. Beatson, S. A., T. Minamino, and M. J. Pallen. 2006. Variation in bacterial flagellins: from sequence to structure. *Trends Microbiol* 14:151-155.
340. Brown, A., and C. E. Hormaeche. 1989. The antibody response to salmonellae in mice and humans studied by immunoblots and ELISA. *Microb Pathog* 6:445-454.
341. Ramos, H. C., M. Rumbo, and J. C. Sirard. 2004. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol* 12:509-517.
342. Drake, D., and T. C. Montie. 1988. Flagella, motility and invasive virulence of Pseudomonas aeruginosa. *J Gen Microbiol* 134:43-52.
343. Krukonis, E. S., and V. J. DiRita. 2003. From motility to virulence: Sensing and responding to environmental signals in Vibrio cholerae. *Curr Opin Microbiol* 6:186-190.
344. Ottemann, K. M., and A. C. Lowenthal. 2002. Helicobacter pylori uses motility for initial colonization and to attain robust infection. *Infect Immun* 70:1984-1990.
345. Lillehoj, E. P., B. T. Kim, and K. C. Kim. 2002. Identification of Pseudomonas aeruginosa flagellin as an adhesin for Muc1 mucin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282:L751-756.
346. Giron, J. A., A. G. Torres, E. Freer, and J. B. Kaper. 2002. The flagella of enteropathogenic Escherichia coli mediate adherence to epithelial cells. *Mol Microbiol* 44:361-379.
347. Amer, A., L. Franchi, T. D. Kanneganti, M. Body-Malapel, N. Ozoren, G. Brady, S. Meshinchi, R. Jagirdar, A. Gewirtz, S. Akira, and G. Nunez. 2006. Regulation of Legionella phagosome maturation and infection through flagellin and host Ipaf. *J Biol Chem* 281:35217-35223.
348. Franchi, L., A. Amer, M. Body-Malapel, T. D. Kanneganti, N. Ozoren, R. Jagirdar, N. Inohara, P. Vandenabeele, J. Bertin, A. Coyle, E. P. Grant, and G. Nunez. 2006. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. *Nat Immunol* 7:576-582.
349. Miao, E. A., C. M. Alpuche-Aranda, M. Dors, A. E. Clark, M. W. Bader, S. I. Miller, and A. Aderem. 2006. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nat Immunol* 7:569-575.
350. Miao, E. A., E. Andersen-Nissen, S. E. Warren, and A. Aderem. 2007. TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. *Semin Immunopathol* 29:275-288.

351. Horng, T., G. M. Barton, R. A. Flavell, and R. Medzhitov. 2002. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 420:329-333.
352. Eaves-Pyles, T., K. Murthy, L. Liaudet, L. Virag, G. Ross, F. G. Soriano, C. Szabo, and A. L. Salzman. 2001. Flagellin, a novel mediator of Salmonella-induced epithelial activation and systemic inflammation: I kappa B alpha degradation, induction of nitric oxide synthase, induction of proinflammatory mediators, and cardiovascular dysfunction. *J Immunol* 166:1248-1260.
353. Gohda, J., T. Matsumura, and J. Inoue. 2004. Cutting edge: TNFR-associated factor (TRAF) 6 is essential for MyD88-dependent pathway but not toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing IFN-beta (TRIF)-dependent pathway in TLR signaling. *J Immunol* 173:2913-2917.
354. Picard, C., A. Puel, M. Bonnet, C. L. Ku, J. Bustamante, K. Yang, C. Soudais, S. Dupuis, J. Feinberg, C. Fieschi, C. Elbim, R. Hitchcock, D. Lammas, G. Davies, A. Al-Ghonaium, H. Al-Rayes, S. Al-Jumaah, S. Al-Hajjar, I. Z. Al-Mohsen, H. H. Frayha, R. Rucker, T. R. Hawn, A. Aderem, H. Tufenkeji, S. Haraguchi, N. K. Day, R. A. Good, M. A. Gougerot-Pocidalo, A. Ozinsky, and J. L. Casanova. 2003. Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science* 299:2076-2079.
355. Khan, M. A., J. Kang, and T. S. Steiner. 2004. Enteroaggregative Escherichia coli flagellin-induced interleukin-8 secretion requires Toll-like receptor 5-dependent p38 MAP kinase activation. *Immunology* 112:651-660.
356. Berin, M. C., A. Darfeuille-Michaud, L. J. Egan, Y. Miyamoto, and M. F. Kagnoff. 2002. Role of EHEC O157:H7 virulence factors in the activation of intestinal epithelial cell NF-kappaB and MAP kinase pathways and the upregulated expression of interleukin 8. *Cell Microbiol* 4:635-648.
357. Uematsu, S., M. H. Jang, N. Chevrier, Z. Guo, Y. Kumagai, M. Yamamoto, H. Kato, N. Sougawa, H. Matsui, H. Kuwata, H. Hemmi, C. Coban, T. Kawai, K. J. Ishii, O. Takeuchi, M. Miyasaka, K. Takeda, and S. Akira. 2006. Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells. *Nat Immunol* 7:868-874.
358. Rhee, S. H., H. Kim, M. P. Moyer, and C. Pothoulakis. 2006. Role of MyD88 in phosphatidylinositol 3-kinase activation by flagellin/toll-like receptor 5 engagement in colonic epithelial cells. *J Biol Chem* 281:18560-18568.
359. Yu, Y., S. Nagai, H. Wu, A. S. Neish, S. Koyasu, and A. T. Gewirtz. 2006. TLR5-mediated phosphoinositide 3-kinase activation negatively regulates flagellin-induced proinflammatory gene expression. *J Immunol* 176:6194-6201.
360. Means, T. K., F. Hayashi, K. D. Smith, A. Aderem, and A. D. Luster. 2003. The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells. *J Immunol* 170:5165-5175.
361. Feuillet, V., S. Medjane, I. Mondor, O. Demaria, P. P. Pagni, J. E. Galan, R. A. Flavell, and L. Alexopoulou. 2006. Involvement of Toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12487-12492.
362. Andersen-Nissen, E., K. D. Smith, K. L. Strobe, S. L. Barrett, B. T. Cookson, S. M. Logan, and A. Aderem. 2005. Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9247-9252.
363. Gewirtz, A. T., Y. Yu, U. S. Krishna, D. A. Israel, S. L. Lyons, and R. M. Peek, Jr. 2004. Helicobacter pylori flagellin evades toll-like receptor 5-mediated innate immunity. *J Infect Dis* 189:1914-1920.
364. Gewirtz, A. T. 2006. Flag in the crossroads: flagellin modulates innate and adaptive immunity. *Curr Opin Gastroenterol* 22:8-12.

365. Andersen-Nissen, E., T. R. Hawn, K. D. Smith, A. Nachman, A. E. Lampano, S. Uematsu, S. Akira, and A. Aderem. 2007. Cutting edge: Tlr5-/- mice are more susceptible to Escherichia coli urinary tract infection. *J Immunol* 178:4717-4720.
366. Honko, A. N., and S. B. Mizel. 2004. Mucosal administration of flagellin induces innate immunity in the mouse lung. *Infect Immun* 72:6676-6679.
367. Vijay-Kumar, M., C. J. Sanders, R. T. Taylor, A. Kumar, J. D. Aitken, S. V. Sitaraman, A. S. Neish, S. Uematsu, S. Akira, I. R. Williams, and A. T. Gewirtz. 2007. Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice. *J Clin Invest* 117:3909-3921.
368. Mizel, S. B., A. N. Honko, M. A. Moors, P. S. Smith, and A. P. West. 2003. Induction of macrophage nitric oxide production by Gram-negative flagellin involves signaling via heteromeric Toll-like receptor 5/Toll-like receptor 4 complexes. *J Immunol* 170:6217-6223.
369. Ramphal, R., V. Balloy, J. Jyot, A. Verma, M. Si-Tahar, and M. Chignard. 2008. Control of Pseudomonas aeruginosa in the lung requires the recognition of either lipopolysaccharide or flagellin. *J Immunol* 181:586-592.
370. Sanders, C. J., D. A. Moore, 3rd, I. R. Williams, and A. T. Gewirtz. 2008. Both radioresistant and hemopoietic cells promote innate and adaptive immune responses to flagellin. *J Immunol* 180:7184-7192.
371. Salazar-Gonzalez, R. M., A. Srinivasan, A. Griffin, G. Muralimohan, J. M. Ertelt, R. Ravindran, A. T. Vella, and S. J. McSorley. 2007. Salmonella flagellin induces bystander activation of splenic dendritic cells and hinders bacterial replication in vivo. *J Immunol* 179:6169-6175.
372. Zamboni, D. S., K. S. Kobayashi, T. Kohlsdorf, Y. Ogura, E. M. Long, R. E. Vance, K. Kuida, S. Mariathasan, V. M. Dixit, R. A. Flavell, W. F. Dietrich, and C. R. Roy. 2006. The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of Legionella pneumophila infection. *Nat Immunol* 7:318-325.
373. Geddes, B. J., L. Wang, W. J. Huang, M. Lavellee, G. A. Manji, M. Brown, M. Jurman, J. Cao, J. Morgenstern, S. Merriam, M. A. Glucksmann, P. S. DiStefano, and J. Bertin. 2001. Human CARD12 is a novel CED4/Apaf-1 family member that induces apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 284:77-82.
374. Poyet, J. L., S. M. Srinivasula, M. Tnani, M. Razmara, T. Fernandes-Alnemri, and E. S. Alnemri. 2001. Identification of Ipaf, a human caspase-1-activating protein related to Apaf-1. *J Biol Chem* 276:28309-28313.
375. Ren, T., D. S. Zamboni, C. R. Roy, W. F. Dietrich, and R. E. Vance. 2006. Flagellin-deficient Legionella mutants evade caspase-1- and Naip5-mediated macrophage immunity. *PLoS Pathog* 2:e18.
376. Molofsky, A. B., L. M. Shetron-Rama, and M. S. Swanson. 2005. Components of the Legionella pneumophila flagellar regulon contribute to multiple virulence traits, including lysosome avoidance and macrophage death. *Infect Immun* 73:5720-5734.
377. Kimbrough, T. G., and S. I. Miller. 2002. Assembly of the type III secretion needle complex of Salmonella typhimurium. *Microbes Infect* 4:75-82.
378. Molofsky, A. B., B. G. Byrne, N. N. Whitfield, C. A. Madigan, E. T. Fuse, K. Tateda, and M. S. Swanson. 2006. Cytosolic recognition of flagellin by mouse macrophages restricts Legionella pneumophila infection. *J Exp Med* 203:1093-1104.
379. Patel, J. C., and J. E. Galan. 2005. Manipulation of the host actin cytoskeleton by Salmonella--all in the name of entry. *Curr Opin Microbiol* 8:10-15.
380. Dinarello, C. A. 1998. Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Ann N Y Acad Sci* 856:1-11.
381. Takeda, K., H. Tsutsui, T. Yoshimoto, O. Adachi, N. Yoshida, T. Kishimoto, H. Okamura, K. Nakanishi, and S. Akira. 1998. Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. *Immunity* 8:383-390.

382. Chen, L. M., K. Kaniga, and J. E. Galan. 1996. Salmonella spp. are cytotoxic for cultured macrophages. *Mol Microbiol* 21:1101-1115.
383. Shi, Y. 2002. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 9:459-470.
384. Fink, S. L., and B. T. Cookson. 2005. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun* 73:1907-1916.
385. Andersen-Nissen, E., K. D. Smith, R. Bonneau, R. K. Strong, and A. Aderem. 2007. A conserved surface on Toll-like receptor 5 recognizes bacterial flagellin. *J Exp Med* 204:393-403.
386. Gracie, J. A., S. E. Robertson, and I. B. McInnes. 2003. Interleukin-18. *J Leukoc Biol* 73:213-224.
387. Moore, K. J., L. P. Andersson, R. R. Ingalls, B. G. Monks, R. Li, M. A. Arnaout, D. T. Golenbock, and M. W. Freeman. 2000. Divergent response to LPS and bacteria in CD14-deficient murine macrophages. *J Immunol* 165:4272-4280.
388. Jacobs, M., N. Brown, N. Allie, and B. Ryffel. 2000. Fatal Mycobacterium bovis BCG infection in TNF-LT-alpha-deficient mice. *Clin Immunol* 94:192-199.
389. Pasparakis, M., L. Alexopoulou, V. Episkopou, and G. Kollias. 1996. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J Exp Med* 184:1397-1411.
390. Olleros, M. L., R. Guler, D. Vesin, R. Parapanov, G. Marchal, E. Martinez-Soria, N. Corazza, J. C. Pache, C. Mueller, and I. Garcia. 2005. Contribution of transmembrane tumor necrosis factor to host defense against Mycobacterium bovis bacillus Calmette-guerin and Mycobacterium tuberculosis infections. *Am J Pathol* 166:1109-1120.
391. Olleros, M. L., R. Guler, N. Corazza, D. Vesin, H. P. Eugster, G. Marchal, P. Chavarot, C. Mueller, and I. Garcia. 2002. Transmembrane TNF induces an efficient cell-mediated immunity and resistance to Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin infection in the absence of secreted TNF and lymphotoxin-alpha. *J Immunol* 168:3394-3401.
392. Ruuls, S. R., R. M. Hoek, V. N. Ngo, T. McNeil, L. A. Lucian, M. J. Janatpour, H. Korner, H. Scheerens, E. M. Hessel, J. G. Cyster, L. M. McEvoy, and J. D. Sedgwick. 2001. Membrane-bound TNF supports secondary lymphoid organ structure but is subservient to secreted TNF in driving autoimmune inflammation. *Immunity* 15:533-543.
393. Keane, J., S. Gershon, R. P. Wise, E. Mirabile-Levens, J. Kasznica, W. D. Schwieterman, J. N. Siegel, and M. M. Braun. 2001. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med* 345:1098-1104.
394. Mohan, A. K., M. Hauptmann, D. M. Freedman, E. Ron, G. M. Matanoski, J. H. Lubin, B. H. Alexander, J. D. Boice, Jr., M. M. Doody, and M. S. Linet. 2003. Cancer and other causes of mortality among radiologic technologists in the United States. *Int J Cancer* 103:259-267.
395. Gewirtz, A. T., M. Vijay-Kumar, S. R. Brant, R. H. Duerr, D. L. Nicolae, and J. H. Cho. 2006. Dominant-negative TLR5 polymorphism reduces adaptive immune response to flagellin and negatively associates with Crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290:G1157-1163.
396. Ozoren, N., J. Masumoto, L. Franchi, T. D. Kanneganti, M. Body-Malapel, I. Erturk, R. Jagirdar, L. Zhu, N. Inohara, J. Bertin, A. Coyle, E. P. Grant, and G. Nunez. 2006. Distinct roles of TLR2 and the adaptor ASC in IL-1beta/IL-18 secretion in response to Listeria monocytogenes. *J Immunol* 176:4337-4342.

397. Cleveland, M. G., J. D. Gorham, T. L. Murphy, E. Tuomanen, and K. M. Murphy. 1996. Lipoteichoic acid preparations of gram-positive bacteria induce interleukin-12 through a CD14-dependent pathway. *Infect Immun* 64:1906-1912.
398. Deckert, M., S. Virna, M. Sakowicz-Burkiewicz, S. Lutjen, S. Soltek, H. Bluethmann, and D. Schluter. 2007. Interleukin-1 receptor type 1 is essential for control of cerebral but not systemic listeriosis. *Am J Pathol* 170:990-1002.
399. Echchannaoui, H., K. Frei, M. Letiembre, R. M. Strieter, Y. Adachi, and R. Landmann. 2005. CD14 deficiency leads to increased MIP-2 production, CXCR2 expression, neutrophil transmigration, and early death in pneumococcal infection. *J Leukoc Biol* 78:705-715.
400. Wiersinga, W. J., A. F. de Vos, C. W. Wieland, M. Leendertse, J. J. Roelofs, and T. van der Poll. 2008. CD14 impairs host defense against gram-negative sepsis caused by Burkholderia pseudomallei in mice. *J Infect Dis* 198:1388-1397.
401. Dessing, M. C., S. Knapp, S. Florquin, A. F. de Vos, and T. van der Poll. 2007. CD14 facilitates invasive respiratory tract infection by Streptococcus pneumoniae. *Am J Respir Crit Care Med* 175:604-611.
402. Didierlaurent, A., I. Ferrero, L. A. Otten, B. Dubois, M. Reinhardt, H. Carlsen, R. Blomhoff, S. Akira, J. P. Kraehenbuhl, and J. C. Sirard. 2004. Flagellin promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2-type response. *J Immunol* 172:6922-6930.
403. Sha, Q., A. Q. Truong-Tran, J. R. Plitt, L. A. Beck, and R. P. Schleimer. 2004. Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31:358-364.
404. Zeng, H., A. Q. Carlson, Y. Guo, Y. Yu, L. S. Collier-Hyams, J. L. Madara, A. T. Gewirtz, and A. S. Neish. 2003. Flagellin is the major proinflammatory determinant of enteropathogenic Salmonella. *J Immunol* 171:3668-3674.
405. Rumbo, M., C. Nempont, J. P. Kraehenbuhl, and J. C. Sirard. 2006. Mucosal interplay among commensal and pathogenic bacteria: lessons from flagellin and Toll-like receptor 5. *FEBS Lett* 580:2976-2984.
406. Noulin, N., V. F. Quesniaux, S. Schnyder-Candrian, B. Schnyder, I. Maillet, T. Robert, B. B. Vargaftig, B. Ryffel, and I. Couillin. 2005. Both hemopoietic and resident cells are required for MyD88-dependent pulmonary inflammatory response to inhaled endotoxin. *J Immunol* 175:6861-6869.
407. Didierlaurent, A., J. Goulding, S. Patel, R. Snelgrove, L. Low, M. Bebien, T. Lawrence, L. S. van Rijt, B. N. Lambrecht, J. C. Sirard, and T. Hussell. 2008. Sustained desensitization to bacterial Toll-like receptor ligands after resolution of respiratory influenza infection. *J Exp Med* 205:323-329.
408. Hawn, T. R., W. R. Berrington, I. A. Smith, S. Uematsu, S. Akira, A. Aderem, K. D. Smith, and S. J. Skerrett. 2007. Altered inflammatory responses in TLR5-deficient mice infected with Legionella pneumophila. *J Immunol* 179:6981-6987.
409. Munger, J. S., X. Huang, H. Kawakatsu, M. J. Griffiths, S. L. Dalton, J. Wu, J. F. Pittet, N. Kaminski, C. Garat, M. A. Matthay, D. B. Rifkin, and D. Sheppard. 1999. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 96:319-328.
410. Underhill, D. M., and A. Ozinsky. 2002. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol* 20:825-852.
411. Gwinn, M. R., and V. Vallyathan. 2006. Respiratory burst: role in signal transduction in alveolar macrophages. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 9:27-39.
412. Lodes, M. J., Y. Cong, C. O. Elson, R. Mohamath, C. J. Landers, S. R. Targan, M. Fort, and R. M. Hershberg. 2004. Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *J Clin Invest* 113:1296-1306.

413. Sitaraman, S. V., J. M. Klapproth, D. A. Moore, 3rd, C. Landers, S. Targan, I. R. Williams, and A. T. Gewirtz. 2005. Elevated flagellin-specific immunoglobulins in Crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288:G403-406.
414. McInnes, I. B., and G. Schett. 2007. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 7:429-442.
415. Firestein, G. S. 2003. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423:356-361.
416. Saunders, B. M., S. Tran, S. Ruuls, J. D. Sedgwick, H. Briscoe, and W. J. Britton. 2005. Transmembrane TNF is sufficient to initiate cell migration and granuloma formation and provide acute, but not long-term, control of Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol* 174:4852-4859.
417. Bekker, L. G., A. L. Moreira, A. Bergtold, S. Freeman, B. Ryffel, and G. Kaplan. 2000. Immunopathologic effects of tumor necrosis factor alpha in murine mycobacterial infection are dose dependent. *Infect Immun* 68:6954-6961.
418. Kindler, V., A. P. Sappino, G. E. Grau, P. F. Piguet, and P. Vassalli. 1989. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell* 56:731-740.
419. Grell, M., E. Douni, H. Wajant, M. Lohden, M. Clauss, B. Maxeiner, S. Georgopoulos, W. Lesslauer, G. Kollias, K. Pfizenmaier, and P. Scheurich. 1995. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83:793-802.
420. Kusters, S., G. Tiegs, L. Alexopoulou, M. Pasparakis, E. Douni, G. Kunstle, H. Bluethmann, A. Wendel, K. Pfizenmaier, G. Kollias, and M. Grell. 1997. In vivo evidence for a functional role of both tumor necrosis factor (TNF) receptors and transmembrane TNF in experimental hepatitis. *Eur J Immunol* 27:2870-2875.
421. Lucas, R., P. Juillard, E. Decoster, M. Redard, D. Burger, Y. Donati, C. Giroud, C. Monso-Hinard, T. De Kesel, W. A. Buurman, M. W. Moore, J. M. Dayer, W. Fiers, H. Bluethmann, and G. E. Grau. 1997. Crucial role of tumor necrosis factor (TNF) receptor 2 and membrane-bound TNF in experimental cerebral malaria. *Eur J Immunol* 27:1719-1725.
422. Holtmann, M. H., and M. F. Neurath. 2004. Differential TNF-signaling in chronic inflammatory disorders. *Curr Mol Med* 4:439-444.
423. Canault, M., F. Peiretti, C. Mueller, F. Kopp, P. Morange, S. Rihs, H. Portugal, I. Juhan-Vague, and G. Nalbone. 2004. Exclusive expression of transmembrane TNF-alpha in mice reduces the inflammatory response in early lipid lesions of aortic sinus. *Atherosclerosis* 172:211-218.
424. Alexopoulou, L., K. Kranidioti, S. Xanthoulea, M. Denis, A. Kotanidou, E. Douni, P. J. Blackshear, D. L. Kontoyiannis, and G. Kollias. 2006. Transmembrane TNF protects mutant mice against intracellular bacterial infections, chronic inflammation and autoimmunity. *Eur J Immunol* 36:2768-2780.

**Laure JANOT**

# Rôle des récepteurs Toll-Like et de CD14 dans la réponse à *Listeria monocytogenes* et à la flagelline extraite de *Salmonella typhimurium*

L'organisme est exposé à divers agents infectieux et doit mettre en place une réponse immunitaire adéquate pour se protéger. Mes travaux de thèse m'ont permis d'étudier la réponse innée à l'infection par *Listeria monocytogenes* (L.m) et l'inflammation pulmonaire induite par la flagelline extraite de *Salmonella typhimurium*. Mes résultats ont mis en évidence l'association du co-récepteur CD14 avec TLR2 (Toll-like Receptor 2) dans la détection de L.m injectée par voie veineuse. En revanche, CD14 ne semble pas être associé au TLR5 dans la reconnaissance de la flagelline. Par ailleurs, l'activation des TLR par leurs ligands permet la synthèse de cytokines intervenant dans l'inflammation. J'ai ainsi pu étudier plus précisément le TNF (Tumor Necrosis Factor). Cette protéine pro-inflammatoire est un des médiateurs principaux de l'immunité et existe sous une forme membranaire qui a été peu étudiée (Mem-TNF) et sous une forme soluble bien connue (sTNF). Mes études ont montré que ce Mem-TNF active la production de cytokines et de médiateurs chimiques de l'inflammation conférant une protection partielle contre Listéria. L'étude de cette cytokine membranaire nous a permis de tester une nouvelle génération de traitements moins agressifs que les anti-TNF contre l'arthrite rhumatoïde ou la maladie de Crohn.

**MOTS CLES :** TLR2, TLR5, CD14, *listeria monocytogenes*, TNF, flagelline, inflammation pulmonaire

# Implication of the Toll-Like Réceptor and CD14 in response to *Listeria monocytogenes* and flagellin from *Salmonella typhimurium*

Toll-like receptors (TLRs) recognize a wide range of microbial pathogens and their products modulate the innate immune response that may lead to inflammation. In order to better understand the host-pathogen relationship, we have studied the implication of the co-receptor CD14 in the innate immune response to *Listeria monocytogenes* and to the bacterial flagellin from *Salmonella typhimurium*. Our results clearly show that TLR2 requires CD14 to control *Listeria* infection whereas TLR5 does not. Moreover, TLR activation leads to pro-inflammatory cytokines production such as Tumor Necrosis Factor (TNF). This pleiotropic protein is required for normal development and function of the immune system. TNF can be secreted (sTNF) or associated to the membrane (Mem-TNF). Our results suggest that Mem-TNF can activate the synthesis of cytokines and chemicals mediators of inflammation and partially protect mice from a moderate infection. These experiments open new avenues for the treatment of inflammatory disease like rheumatoid arthritis or Crohn disease.

**KEYWORDS :** TLR2, TLR5, CD14, *listeria monocytogenes*, TNF, flagellin, pulmonary inflammation

**UMR6218 – Laboratoire d'Immunologie et d'Embryologie Moléculaire**

**3B rue de la Férollerie 45071 Orléans**