



HAL
open science

**MECANISMES DE RECONNAISSANCE DES
SIGNAUX DE DANGER PAR LES CELLULES
DENDRITIQUES DE LA PEAU ET DES
MUQUEUSES : APPLICATION A L'ETUDE DE
L'INFECTION PAR LE VIH DANS UN MODELE DE
MUQUEUSE VAGINALE HUMAINE INTEGRANT
DES CELLULES DE LANGERHANS**

Marielle Bouschbacher

► **To cite this version:**

Marielle Bouschbacher. MECANISMES DE RECONNAISSANCE DES SIGNAUX DE DANGER PAR LES CELLULES DENDRITIQUES DE LA PEAU ET DES MUQUEUSES : APPLICATION A L'ETUDE DE L'INFECTION PAR LE VIH DANS UN MODELE DE MUQUEUSE VAGINALE HUMAINE INTEGRANT DES CELLULES DE LANGERHANS. Immunologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2007. Français. NNT : . tel-00285597

HAL Id: tel-00285597

<https://theses.hal.science/tel-00285597>

Submitted on 5 Jun 2008

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

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

THESE

présentée

devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

présentée et soutenue publiquement le 16 octobre 2007

par

Marielle BOUSCHBACHER

**Mécanismes de reconnaissance des signaux de danger par
les cellules dendritiques de la peau et des muqueuses :
application à l'étude de l'infection par le VIH dans un
modèle de muqueuse vaginale humaine intégrant des
cellules de Langerhans**

Dr. Colette DEZUTTER-DAMBUYANT
Dr. Jenny VALLADEAU
Dr. Anne HOSMALIN
Pr. Pascale JEANNIN
Dr. Annie BLACK
Pr. Alain CLAUDY

Directrice de thèse
Co-directrice de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université
Vice-Président du Conseil Scientifique
Vice-Président du Conseil d'Administration
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie
universitaire
Secrétaire Général

M. le Professeur L. COLLET
M. le Professeur J.F. MORNEX
M. le Professeur J. LIETO
M. le Professeur D. SIMON

M. G. GAY

SECTEUR SANTE

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec
UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche
UFR de Médecine Lyon-Nord
UFR de Médecine Lyon-Sud
UFR d'Odontologie
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
Institut Techniques de Réadaptation
Département de Formation et Centre de Recherche en
Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur D. VITAL-DURAND
Directeur : M. le Professeur X. MARTIN
Directeur : M. le Professeur F. MAUGUIERE
Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY
Directeur : M. O. ROBIN
Directeur : M. le Professeur F. LOCHER
Directeur : M. le Professeur MATILLON
Directeur : M. le Professeur P. FARGE

SECTEUR SCIENCES

Composantes

UFR de Physique
UFR de Biologie
UFR de Mécanique
UFR de Génie Electrique et des Procédés
UFR Sciences de la Terre
UFR de Mathématiques
UFR d'Informatique
UFR de Chimie Biochimie
UFR STAPS
Observatoire de Lyon
Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de
Lyon
IUT A
IUT B
Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur A. HOAREAU
Directeur : M. le Professeur H. PINON
Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Directeur : M. le Professeur A. BRIGUET
Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE
Directeur : M. le Professeur M. CHAMARIE
Directeur : M. le Professeur M. EGEA
Directeur : M. le Professeur H. PARROT
Directeur : M. le Professeur R. MASSARELLI
Directeur : M. le Professeur R. BACON
Directeur : M. le Professeur J. LIETO

Directeur : M. le Professeur M. C. COULET
Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE
Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé principalement dans l'unité INSERM U346 /EA3732 dirigée par le docteur Daniel Schmitt puis s'est achevé dans l'unité INSERM U590 dirigée par le professeur Alain Puisieux.

Tout d'abord, je souhaite remercier le professeur Pascale Jeannin et le docteur Anne Hosmalin pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de ce travail de thèse, le docteur Annie Black et le professeur Alain Claudy pour avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Je souhaite tout particulièrement remercier les docteurs Jenny Valladeau et Colette Dezutter-Dambuyant, qui m'ont donné l'opportunité de réaliser cette thèse à leurs côtés, pour m'avoir permis de m'enrichir à la fois scientifiquement et personnellement durant ces dernières années de doctorat. Je leur suis reconnaissance pour toutes les connaissances et les savoir-faire scientifiques qu'elles m'ont transmis : Jenny et son expertise des cellules dendritiques, Colette et les modèles tridimensionnels cutanés et muqueux sans oublier le VIH. Grâce aux nombreuses discussions et interactions que nous avons pu entretenir, mon esprit critique ainsi que ma réflexion scientifique se sont développés. Enfin, je les remercie pour leurs disponibilités, leurs nombreux conseils, ainsi que leur générosité qui m'ont beaucoup apportés. Je leur souhaite beaucoup de succès dans leur nouvel environnement scientifique au sein de l'équipe du docteur Christophe Caux de l'unité INSERM U590.

Je tiens à remercier Christophe Caux pour m'avoir accueilli cette année au sein de son équipe suite à notre départ de l'ex unité INSERM U346/EA3732. Merci aussi à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer au centre Léon Bérard et plus particulièrement aux étudiants, techniciens et chercheurs de l'équipe Cytokines et Cancers pour leur chaleureux accueil, leur gentillesse et les agréables moments, bien que courts, passés avec eux.

Un grand merci à Sandrine et Sandy, mes premières collègues de labo, pour m'avoir initié au travail de laboratoire et plus particulièrement à la culture cellulaire et à l'ingénierie tissulaire. Un grand clin d'œil à mes copines de bureau, Laetitia et Marie-Aude. Je les remercie pour toutes nos grandes discussions tant scientifiques que très personnelles, nos fous rires et autres moments de détente, en bref pour toutes ces journées passées ensemble au labo. Je suis également reconnaissance à Estelle, avec qui nous animions seules le grand labo du 2^{ème} et avec qui j'ai eu grand plaisir à travailler. Merci pour sa bonne humeur, et sa précieuse aide technique.

Je remercie également les donateurs anonymes, le personnel infirmier du bloc opératoire du Service de Gynécologie de l'Hôpital Edouard Herriot ainsi le chirurgien plastique Eric Weill et son équipe de la clinique Emilie de Viallard pour les prélèvements qu'ils nous ont fournis.

Merci à l'ANRS pour la bourse de thèse et les financements de labo qui m'ont permis de réaliser cette thèse. Merci également au docteur Morgane Bomsel pour m'avoir accueilli

dans son labo durant quelques mois et, à Séverine Garcia pour m'avoir initié à la virologie et à la manipulation du VIH.

Un très grand merci à l'ensemble de mes amis : aux messins, en particulier aux copains de Fabert, aux lyonnais amateurs de montagne et de bons vins, aux Diamonds pour nos intenses moments de softball et aux custards. Merci à tous pour leur amitié.

Il me reste à remercier ma Famille. Les mots sont difficiles à trouver pour exprimer ma reconnaissance pour leur soutien, leur aide et leurs encouragements. En particulier merci aux Fehrentz et Balzan, et notamment merci à JAF pour m'avoir donné le goût de la science et encouragé dans la voie du doctorat (bien que pas dans son labo !). Merci à mes parents et ma sœur (que de relectures du manuscrit !) pour tant de choses (je ne sais trop comment le dire). Enfin, merci à Ghislain pour sa présence, sa patience quand j'étais si pénible, et son réconfort.

Et maintenant suite de l'aventure à Dijon...

« La science ? Après tout qu'est-elle, sinon une longue et systématique curiosité ? »

André Maurois

Abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique	MBV : <i>Multivesicular Endosomal Body</i>
ARN : Acide RiboNucléique	M-CSF : <i>Monocyte-Colony Stimulating Factor</i>
ARNm : Acide RiboNucléique messenger	MDA-5 : <i>Melanoma Differentiation-Associated gene -5</i>
BG : Granule de Birbeck	mDC : Cellule Dendritique myéloïde
CARD : <i>CAspase Recruiting Domain</i>	MDP : Muramyl Di-Peptide
CD : Cluster de Différenciation	MIP : <i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
CHS : Réaction d'HyperSensibilité de Contact	MMR : <i>Mannose Macrophage Receptor</i>
CL : Cellule de Langerhans	MoDC : Cellule Dendritique dérivée de monocyte
CLA : <i>Cutaneous Lymphocyte Antigen</i>	NK : <i>Natural Killer</i>
CLIP : <i>Class II-associated li peptide</i>	NLR : <i>NOD-Like Receptor</i>
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité	NOD : <i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain</i>
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène	OMS : Organisation Mondiale de la Santé
CTL : Lymphocyte T Cytotoxique	OVA : Ovalbumine
DC : Cellule Dendritique	PAMP : <i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
DC-LAMP : <i>Dendritic Cell-Lysosome Associated Membrane glycoProtein</i>	PBMC : <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
DC-SIGN : <i>Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Nonintegrin</i>	pDC : Cellule Dendritique plasmacytoïde
DDC : Cellule Dendritique Dermique	PGN : Peptidoglycane
DED : Derme DésEpidermisé	PRR : <i>Pattern Recognition Receptor</i>
DRIP : <i>Defective Ribosomal Product</i>	RIG-I : <i>Retinoic acid Inducible Gene-I</i>
DTR : Récepteur de la toxine Diphtérique	RLR : <i>RIG-Like Receptor</i>
Flt3 : <i>fms-like tyrosine kinase 3</i>	RT : <i>Transcriptase Reverse</i>
GalCer : GalactosylCéramide	SCF : <i>Stem Cell Factor</i>
GCDC : Cellule Dendritique des Centres Germinatifs	SDF : <i>Stromal Derived Factor</i>
GM-CSF : <i>Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>	SI/NSI : Inducteur de Syncitium/ Non Inducteur de Syncitium
HDMEC : <i>Human Dermal Microvascular Endothelial Cell</i>	SIDA : Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquise
HSV : Virus de l'Herpès Simplex	SIV : Virus de l'Immunodéficience Simienne
IDC : Cellule Dendritique Interdigitée	TAP : <i>Transporter-Associated with antigen Processing</i>
IFN : Interféron	TAR : <i>Tat Responsible Region</i>
Ig : Immunoglobuline	TCR : Récepteur des Lymphocytes T
IL : Interleukine	TEER : <i>Trans Epithelial Electric Resistance</i>
IST : Infection Sexuellement Transmissible	TGF : <i>Transforming Growth Factor</i>
ITAM : <i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif</i>	TLR : <i>Toll Like Receptor</i>
JAM : <i>Junctional Adhesion Molecule</i>	TNF : <i>Tumor Necrosis Factor</i>
KO : <i>Knock-Out</i>	VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
LPS : Lipopolysaccharide	ZO : <i>Zonula Occludens</i>
LSP1 : <i>Leukocyte-Specific Protein 1</i>	
LT : Lymphocyte T	
LTA : Acide lipoteichoïque	
LTR : <i>Long Terminal Repeat</i>	

Sommaire

Introduction.....	1
Chapitre 1 : Etude bibliographique.....	5
1. LES CELLULES DENDRITIQUES	6
A. Les cellules dendritiques de la peau et des muqueuses	6
1. Diversité des cellules dendritiques dans l'organisme.....	6
a. Phénotype des cellules dendritiques.....	6
b. Distribution <i>in situ</i> des cellules dendritiques.....	7
b.1. Les cellules dendritiques circulantes.....	8
b.2. Les cellules dendritiques des organes lymphoïdes.....	9
b.3. Les cellules dendritiques périphériques.....	10
2. Les cellules de Langerhans	10
3. Les cellules dendritiques dermiques.....	11
4. Origine et différenciation des cellules dendritiques cutanées.....	13
a. Origine des cellules dendritiques cutanées.....	13
a.1. Chez l'homme	13
a.2. Chez la souris	14
b. Génération <i>in vitro</i> de cellules dendritiques humaines.....	14
b.1. Génération de cellules dendritiques à partir de progéniteurs hématopoïétiques CD34 ⁺	15
b.2. Génération de cellules dendritiques à partir de monocytes	16
B. Reconnaissance des signaux de danger	17
1. Les lectines de type C	17
a. Récepteur du mannose des macrophages	18
b. DC-SIGN et Langerin	18
c. LSEctin.....	19
d. Dectin-1.....	19
2. Les récepteurs <i>scavengers</i>	20
a. SRA.....	21
b. MARCO.....	21
c. CLA-1/SR-BI.....	22
d. LOX-1.....	22
e. SREC-I.....	23
f. SR-PSOX/CXCL16.....	23
3. Les récepteurs <i>Toll-Like</i>	24
a. Expression des TLR par les cellules dendritiques	24
b. Les ligands des récepteurs Toll-Like.....	25
b.1. Reconnaissance des bactéries	25
b.2. Reconnaissance des virus	26
c. Signalisation induite par les TLR.....	26
c.1. Voie MyD88 dépendante.....	27
c.2. Voie MyD88 indépendante	27
4. Les récepteurs cytosoliques.....	27
a. Les récepteurs RIG-like	28
b. Les récepteurs NOD-like.....	29
5. Collaboration entre Pattern Recognition Receptors	30
C. Autres fonctions des cellules dendritiques	31
1. Apprêtement et présentation de l'antigène aux lymphocytes T.....	31
a. Apprêtement d'antigènes exogènes par le CMH de classe II.....	31
b. Apprêtement d'antigènes endogènes par le CMH de classe I	32

c.	Présentation croisée d'antigènes exogènes par le CMH de classe I	32
2.	Induction et orientation de la réponse immunitaire	33
a.	Polarisation de la réponse T CD4 ⁺	33
a.1.	Th1 versus Th2.....	34
a.2.	Th17	35
b.	Activation des lymphocytes T CD8 ⁺	35
c.	Interaction avec les cellules NK.....	36
d.	Interaction avec les lymphocytes T régulateurs	36
3.	Cas particulier des cellules de Langerhans et des cellules dendritiques dermiques	37
a.	Capture antigénique et activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques cutanées	37
b.	Rôle des cellules de Langerhans et les cellules dendritiques dermiques dans l'immunité cutanée	38
c.	Implications d'autres cellules dendritiques dans les maladies cutanées inflammatoires.....	40

2. ROLE DES CELLULES DENDRITIQUES DES MUQUEUSES DANS LA TRANSMISSION DU VIH PAR VOIE SEXUELLE 41

A.	Le virus de l'immunodéficience humaine.....	41
1.	Epidémiologie	41
2.	Structure de la particule virale	41
3.	Organisation génétique.....	42
4.	Cycle de réplication virale.....	43
a.	Reconnaissance et entrée virale.....	43
a.1.	Le récepteur CD4	43
a.2.	Les co-récepteurs CXCR4 et CCR5	43
a.3.	Autres récepteurs cellulaires	44
b.	Transcription inverse et intégration.....	45
c.	Transcription du génome viral	45
d.	Traduction et bourgeonnement.....	46
B.	Les épithéliums	46
1.	Classification.....	46
a.	Les épithéliums monostratifiés.....	47
b.	Les épithéliums pluristratifiés	47
2.	La muqueuse génitale féminine : le col utérin et le vagin	48
a.1.	Organisation de la muqueuse	48
b.	Répartition des cellules du système immunitaire	48
3.	Les modèles de muqueuses pluristratifiées reconstruites <i>in vitro</i>	49
4.	Les jonctions serrées	50
a.	Structure et organisation moléculaire des jonctions serrées	51
a.1.	Les protéines transmembranaires	51
a.2.	Les protéines de la plaque cytoplasmique	53
b.	Les jonctions serrées dans les épithéliums malpighiens.....	54
c.	Expression des protéines des jonctions serrées par les cellules dendritiques	55
d.	Interaction des jonctions serrées avec le VIH	56
C.	Interaction des cellules dendritiques avec le VIH	57
1.	Les cellules dendritiques et l'infection par le VIH.....	57
a.	Infection des cellules dendritiques par le VIH	57
b.	Modulation de la susceptibilité des cellules dendritiques à l'infection au VIH	58
c.	Modulation des fonctions des cellules dendritiques par l'infection au VIH.....	58
2.	Attachement, capture et fusion du VIH sur les DC	59
3.	Transfert du VIH aux lymphocytes T CD4 ⁺	60
a.	Transfert par trans-infection.....	61
a.1.	Trans-infection via la synapse infectieuse.....	61
a.2.	Trans-infection via des exosomes	61
b.	Cis-infection.....	62
c.	DC-SIGN, indispensable pour la transmission ?	62

D. La transmission du VIH au niveau des muqueuses.....	63
1. Mécanismes de passage à travers les muqueuses	63
a. Altération de l'intégrité de l'épithélium	63
a.1. Microtraumatismes au cours des rapports sexuels	64
a.2. Infections sexuellement transmissibles	64
a.3. Modifications de l'épithélium sous l'effet d'hormones.....	64
b. Infection des cellules épithéliales.....	64
c. Transport <i>via</i> les cellules épithéliales, la transcytose	65
d. Transmigration de cellules infectées	66
e. Capture par des cellules du système immunitaire	66
2. Transmission préférentielle des virus de type R5.....	67
3. Prévention de la transmission sexuelle du VIH.....	68
a. Les microbicides	68
a.1. Composés qui améliorent les défenses vaginales	69
a.2. Surfactants.....	69
a.3. Agents inhibiteurs d'entrée ciblant l'enveloppe virale.....	70
a.4. Inhibiteurs d'entrée ciblant la cellule hôte	71
a.5. Inhibiteurs de la réplication.....	71
b. La circoncision	72

Chapitre d'ouvrage.....74

Chapitre 2 : Résultats et Discussion.....75

1. EXPRESSION DES RECEPTEURS DE L'IMMUNITE INNEE PAR LES CELLULES DENDRITIQUES CUTANEES 76

A. Article 1: Langerhans cells express a specific TLR profile and differentially respond to viruses and Gram-positive bacteria 76

B. Article 2 : Expression and function of innate receptors by freshly isolated human dermal dendritic cells..... 78

C. Discussion: expression des récepteurs de l'immunité innée par les cellules dendritiques cutanées. 80

1. Le modèle : les cellules dendritiques cutanées humaines fraîchement isolées	80
2. Caractérisation des cellules dendritiques dermiques	80
a. Les cellules exprimant HLA-DR dans le derme.....	80
b. Les cellules dendritiques dermiques.....	81
b.1. Phénotype hétérogène	81
b.2. Distinction avec les macrophages	82
c. Viabilité en culture	83
3. Expression des TLR par les cellules dendritiques cutanées	84
a. Expression des TLR par les cellules de Langerhans	84
b. Expression des TLR par les cellules dendritiques dermiques	85
4. Expression des TLR par les cellules cutanées non immunitaires	86
a. Expression des TLR par les kératinocytes.....	86
b. Expression des TLR par les cellules endothéliales dermiques	87
5. Expression des récepteurs cytosoliques RLR et NLR	88
6. Orientation de la réponse immunitaire	88
a. Coopération entre les <i>Pattern Recognition Receptors</i>	88
b. Polarisation de la réponse lymphocytaire T CD4 ⁺	90
c. Activation des lymphocytes T cytotoxiques.....	90
d. Rôle des cellules de l'environnement cutané dans l'orientation de la réponse immunitaire	91
7. Rôle des CL et des DDC dans l'immunité cutanée	91

2. ARTICLE 3 : EARLY EVENTS IN HIV TRANSMISSION THROUGH A VAGINAL MUCOSA	94
A. Présentation de l'article	94
B. Discussion.....	96
1. Le modèle de muqueuse vaginale reconstruite.....	96
a. Nécessité du modèle.....	96
b. Avantages du modèle	96
2. Expression des protéines des jonctions serrées par les épithéliums pluristratifiés génitaux	98
3. Expression des protéines des jonctions serrées par les cellules de Langerhans	100
4. Passage du VIH par transcytose à travers les cellules épithéliales vaginales ?	101
5. Rôle des cellules de Langerhans dans la transmission du VIH	102
6. Transmigration de cellules infectées ?	104
 Conclusion.....	 106
 Références.....	 108
 Annexe.....	 143

Introduction

Le système immunitaire participe au maintien de l'intégrité de l'organisme en assurant la protection contre les agents pathogènes ou les dérégulations internes de l'organisme tels que les cancers. La réponse immunitaire est déterminée par deux grands mécanismes complémentaires, la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire adaptative. La réponse immunitaire adaptative, hautement spécifique, est caractérisée par l'établissement d'une mémoire immunologique. Ce système utilise un large répertoire de récepteurs, codés par des segments de gènes réarrangés, exprimés par les lymphocytes T et B. La réponse immunitaire innée, au contraire, est très rapide et ne repose pas sur l'expansion clonale lymphocytaire mais sur des récepteurs codés par des gènes ne subissant pas de réarrangements, dénommés *Pattern Recognition Receptors* (PRR). Ces récepteurs reconnaissent des signaux de danger, soit des motifs associés aux micro-organismes, les PAMP (*Pathogen Associated Molecular Pattern*), soit des signaux endogènes dérivés de tissus ou cellules endommagés. Les cellules dendritiques (DC), cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, sont présentes à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. En effet, ces cellules ont la capacité à capturer des antigènes *via* les nombreux récepteurs qu'elles expriment et à les apprêter sur leurs molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Elles migrent alors vers les organes lymphoïdes secondaires où elles vont activer les lymphocytes T naïfs et ainsi initier une réponse immunitaire adaptative spécifique. Les DC sont donc essentielles à la mise en place de la réponse immunitaire.

Les organes périphériques en relation directe avec le milieu extérieur, tels que la peau ou les muqueuses, représentent la porte d'entrée principale des micro-organismes pathogènes. Les DC de ces tissus, les cellules de Langerhans (CL) et les DC interstitielles ou dermiques (DDC) dans le derme, pourraient donc jouer un rôle majeur dans l'immunité de la peau et des muqueuses. Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressées à ces DC et à leur rôle dans l'immunité cutanée, plus particulièrement dans l'immunité innée *via* la reconnaissance des signaux de danger. Nous avons étudié, en particulier, l'expression de certains récepteurs de l'immunité innée. Parmi ces nombreux PRR, nous nous sommes concentrées sur les lectines de type C, les récepteurs *scavengers* et les récepteurs *Toll-Like* (TLR). Actuellement, l'essentiel des études portent sur les DC cutanées murines ou sur des DC générées *in vitro*. Ainsi, afin de mieux comprendre le rôle *in vivo* chez l'homme de ces DC cutanées, nous avons conduit notre travail sur les CL et les DDC fraîchement isolées de peau humaine.

Nous nous sommes ensuite intéressées à une application précise du rôle des CL, en particulier, dans l'immunité des muqueuses en étudiant, plus particulièrement l'infection par virus de l'immunodéficience humaine (VIH). En effet, les muqueuses génitales représentent la voie principale de contagion et de propagation du VIH. Les CL de ces muqueuses, de par leur rôle essentiel dans l'initiation de la réponse immunitaire et leur capacité à migrer, semblent être des cibles majeures du VIH. Nous avons alors examiné le rôle précis des CL dans cette infection. Par ailleurs, nous avons étudié le mécanisme de passage du VIH à travers une muqueuse vaginale en évaluant si le phénomène de transcytose du VIH observé à travers l'épithélium monostratifié intestinal existe au sein de cette muqueuse pluristratifiée, *via* le développement d'un modèle tridimensionnel de muqueuse vaginale humaine reconstruite.

Ce document est divisé en deux grands chapitres, le premier consacré à une étude de la littérature, le second aux travaux réalisés au cours de ce doctorat. Dans le premier chapitre, nous développerons tout d'abord une revue bibliographique axée sur les DC. Nous détaillerons essentiellement les aspects concernant les DC humaines et leur rôle dans l'initiation de la réponse immunitaire. La seconde partie abordera la transmission du VIH à travers les muqueuses génitales. Cette revue bibliographique sera suivie d'un article d'ouvrage rédigé au cours de ce doctorat concernant le VIH et les DC des muqueuses.

Dans le second chapitre, les résultats seront présentés sous forme de publications scientifiques. Dans le premier article, publié dans le *Journal of Immunology*, nous détaillerons l'expression des TLR par les CL humaines fraîchement isolées ainsi que leur réponse à certains ligands de TLR. Le second article, en préparation, examinera les DDC, leur expression de différents PRR et leur fonction. Enfin, dans le troisième article, en révision à *AIDS*, nous présenterons une analyse des événements précoces de l'infection au VIH à travers la muqueuse vaginale humaine et le rôle possible des CL de ces muqueuses. L'ensemble de nos résultats sera discuté et nous aborderons notamment la notion de coopération entre les CL, les DDC et leur environnement dans la mise en place de la réponse immunitaire cutanée.

En conclusion, ce travail aura permis de mieux caractériser les DC cutanées, en particulier par la détermination de leur expression des récepteurs de l'immunité innée. Cette meilleure connaissance des DC cutanées permettra de mieux appréhender leur rôle dans l'immunité de la peau et des muqueuses. Par ailleurs, le modèle de muqueuses vaginale reconstruite développé au cours de cette thèse devrait permettre d'affiner la compréhension des mécanismes de transmission de l'infection au VIH et également à d'autres pathogènes. Enfin, ce modèle pourrait servir de support au développement de stratégies de prévention de la transmission du VIH dans les voies génitales telles que les microbicides.

Chapitre 1 : Etude bibliographique

1. LES CELLULES DENDRITIQUES

Les cellules dendritiques ont été initialement décrites en 1868 par Paul Langerhans dans l'épiderme humain (Langerhans, 1868) puis dans les organes lymphoïdes secondaires murins par R. Steinman (Steinman and Cohn, 1973). Les cellules dendritiques (DC) sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (CPA). De par leur distribution dans tout l'organisme et en particulier dans les tissus périphériques communiquant directement avec le milieu extérieur, les DC jouent un rôle de « sentinelles » du système immunitaire. Bien qu'en faible nombre, elles sont au cœur du déclenchement des réponses immunitaires spécifiques, en exerçant un contrôle sur la spécificité, l'intensité et la nature de la réponse immune, et se placent à l'interface entre l'immunité innée et adaptative.

A. Les cellules dendritiques de la peau et des muqueuses

1. Diversité des cellules dendritiques dans l'organisme

D'origine hématopoïétique, les DC passent durant leur cycle de vie par différents stades de maturation. Elles forment un système hétérogène et complexe, constitué par de nombreuses sous-populations aux fonctions distinctes. Cette diversité des DC est appréciable à plusieurs niveaux selon: (i) leur localisation anatomique et leur phénotype, (ii) leur origine, (iii) leurs fonctions et (iv) la réponse immunitaire induite.

a. Phénotype des cellules dendritiques

Le phénotype des DC n'est pas constant durant leur cycle de vie mais évolue et témoigne de leur stade de maturation ou d'activation, et de leur diversité.

En accord avec leur origine hématopoïétique, les DC humaines expriment la molécule CD45, les marqueurs myéloïdes CD13 et CD33. Les DC sont de lignage négatif, c'est-à-dire qu'elles ne possèdent pas les marqueurs associés aux cellules NK (*Natural Killer*) (CD56 et CD57), aux lymphocytes T (CD3) et B (CD19 et CD20). Cependant la molécule CD4 est exprimée par certaines DC (cellules de Langerhans et DC des centres germinatifs) et CD2 est présent à la surface des DC du sang périphérique. Par ailleurs, la molécule CD83, marqueur des lymphocytes B activés, est fortement exprimée par les DC dites « matures » des zones riches en lymphocytes T des organes lymphoïdes secondaires et par une sous-population des DC du sang (Zhou and Tedder, 1995).

Les DC expriment de nombreux récepteurs impliqués dans la reconnaissance et la capture spécifique d'antigènes. Les DC expriment des récepteurs du complément ou des récepteurs des fragments Fc des immunoglobulines (Ig). D'autres récepteurs de reconnaissance des antigènes sont également retrouvés sur les DC immatures : les lectines de type C, les TLR (*Toll Like Receptor*) ou les récepteurs *scavengers*. L'expression de ces récepteurs et leurs propriétés seront détaillées dans la partie B « Reconnaissance des signaux de danger ».

En accord avec leur rôle dans la présentation antigénique, les DC expriment les molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe I et II ainsi que l'antigène CD74 (chaîne invariante Ii) (Pure et al., 1990). Certaines DC expriment également les molécules CD1 impliquées dans la présentation d'antigènes glycolipidiques : les cellules de Langerhans expriment CD1a, b et c alors que les DC interstitielles du derme expriment CD1b, c et d et plus ou moins CD1a (Brigl and Brenner, 2004). Les molécules de co-stimulation CD40, CD80/B7-1, CD86/B7-2 et sont exprimées de manière variable selon leur stade de maturation. Les DC expriment aussi d'autres molécules de la famille B7, impliquées dans la modulation de l'activation des lymphocytes T, telles que B7-H2/CD275/ICOS-L (*Inducible Costimulator-Ligand*) (Witsch et al., 2002), B7-H1/CD274/PD-L1 (Curiel et al., 2003) et B7-DC/CD273/PD-L2 (Tseng et al., 2001). L'expression de CD134/OX40-Ligand (Ito et al., 2005) et CD137/4-BB1-Ligand (Kim et al., 2002) est également retrouvée. De même, la molécule lysosomiale DC-LAMP (*DC-Lysosome-Associated Membrane glycoProtein*)/CD208 est uniquement exprimée par les DC matures des zones riches en lymphocytes T des organes lymphoïdes secondaires (de Saint-Vis et al., 1998). Enfin, les DC expriment les molécules d'adhérence CD11a (LFA-1), CD11c, CD18, CD29, CD44, CD54 (ICAM-1) et CD58 (LFA-3) (Caux et al., 1996b).

b. Distribution *in situ* des cellules dendritiques

Les DC sont réparties dans tout l'organisme : dans les organes non lymphoïdes tels que la peau et les muqueuses, dans le sang et la lymphe ainsi que dans les organes lymphoïdes.

b.1. Les cellules dendritiques circulantes

Représentant de 0.1 à 1% des cellules mononucléées sanguines (Freudenthal and Steinman, 1990), les DC du sang sont caractérisées par une forte expression du CMH de

classe II (HLA-DR) et par un lignage négatif (O'Doherty et al., 1994). Deux sous-populations basées sur la base de l'expression de CD11c ont été isolées chez l'homme (Robinson et al., 1999) : la population **CD11c⁺** ou **DC myéloïdes** et la population **CD11c⁻** ou **DC plasmacytoïdes**.

⌘ Les cellules myéloïdes du sang

La population **CD11c⁺** ou **DC myéloïdes** (mDC) du sang se sous-divise en trois sous-populations : une population de cellules CD16⁺ CD14 et CD33 faibles représentant 40 à 80% des cellules CD11c⁺, une seconde population CD1b⁺ CD1c⁺ CD33⁺ constituant près de 20 à 50% des cellules CD11c⁺ et enfin une population minoritaire BDCA-3⁺ (thrombomodulin) CD14⁻ CD33⁺ (MacDonald et al., 2002; Piccioli et al., 2007). Une autre équipe a, quant à elle, montré qu'une population de DC, caractérisée par l'expression de CD16 et du 6-sulfo-LacNac et dénommée SlanDC, représente la population majoritaire des mDC du sang (Schakel et al., 2002; Schakel et al., 2006).

⌘ Les cellules plasmacytoïdes du sang

Les **cellules plasmacytoïdes** (pDC), longtemps appelées NIPC (*Natural Interferon Producing Cells*) sont rares (seulement 0.2 à 0.8% des cellules mononucléées du sang périphérique) mais très importantes car elles produisent de fortes quantités d'interféron α (IFN α) en réponse à des stimuli particuliers. Elles ont été identifiées initialement dans les zones T des amygdales, et correspondent aux cellules T plasmacytoïdes précédemment observées dans les ganglions lymphatiques (Grouard et al., 1997). Elles sont caractérisées par une forte expression de CD123/IL3-R α et par l'absence de CD11c, contrairement à leurs homologues murins. Elles expriment également BDCA-2 et BDCA-4/neuropilin-1. Les pDC, durant la vie adulte, sont produites constamment dans la moelle osseuse, circulent dans le sang périphérique puis colonisent les organes lymphoïdes (Dzionek et al., 2001; Liu, 2005).

⌘ Les cellules dendritiques de la lymphe afférente

Les DC de la lymphe afférente sont des cellules dites « **cellules voilées** » du fait de leur morphologie (Steinman, 1991). Ces grandes cellules mononucléées peuvent représenter jusqu'à 20% des cellules de la lymphe et sont considérées comme des cellules en transit des tissus périphériques vers les organes lymphoïdes (Banchereau et al., 2000). Plus récemment,

grâce une technique particulière de canulation, les DC isolées *ex vivo* de la lymphé afférente sont étudiées chez le mouton (Schwartz-Cornil et al., 2006).

b.2. Les cellules dendritiques des organes lymphoïdes

⌘ Les cellules dendritiques interdigitées

Les DC interdigitées (IDC), situées dans les zones extra-folliculaires riches en lymphocytes T ont été observées dans différents organes tels que la rate, les ganglions lymphatiques, les amygdales, les plaques de Peyer et les végétations (Steinman, 1991). Elles sont caractérisées par une forte expression du CMH de classe II, du CD40, des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 et du CD83 (Vyth-Dreese et al., 1995; Bjorck et al., 1997; Summers et al., 2001) et par l'expression de DC-LAMP (de Saint-Vis et al., 1998).

⌘ Les cellules dendritiques des centres germinatifs

Les DC des centres germinatifs (GCDC) ont été initialement identifiées au niveau des follicules B des centres germinatifs (Grouard et al., 1996). Ces cellules sont également présentes au sein de la rate et des ganglions lymphatiques. Contrairement aux IDC, elles expriment faiblement CD40, CD80 et CD86 mais pas DC-LAMP, et de plus elles expriment fortement CD54 (Goval et al., 2006). *In vitro*, les GCDC sont capables d'activer en culture des lymphocytes T allogéniques et de stimuler la prolifération des lymphocytes B des centres germinatifs en présence d'interleukine 2 (IL-2) et de CD40 (Dubois et al., 1999).

⌘ Les cellules dendritiques du thymus et de la rate

Le thymus contient trois populations de DC : une population majoritaire CD11c⁺ HLA-DR⁺ CD11b⁻ CD14⁻, une seconde population CD11c⁺ HLA-DR⁺ CD11b⁺ CD14⁺ présentant des caractéristiques communes aux GCDC et enfin une dernière population constituée de pDC (Bendriss-Vermare et al., 2001; Schmitt et al., 2007).

Dans la rate, quatre populations de DC ont été caractérisées : (i) des DC immatures résidentes CD11c⁺ CD83⁻ CD86⁻ situées dans la zone marginale, (ii) des DC matures CD11c⁺ CD83⁺ CD86⁺ dans les zones T, (iii) des DC CD11c⁺ CD83⁻ CD86⁻ apparentées aux GCDC dans les zones B et (iv) des pDC (McIlroy et al., 2001).

b.3. Les cellules dendritiques périphériques

Localisées au niveau des muqueuses et de la peau, **les cellules de Langerhans (CL)**, sont retrouvées dans la majorité des épithéliums pluristratifiés (vagin, cornée, etc...) et des épithéliums simples (estomac, utérus, poumon, etc...) (de Fraissinette et al., 1989). Les **DC dites interstitielles** ont également été décrites dans les espaces interstitiels des différents organes et tissus conjonctifs (derme ou chorion, cœur, foie, pancréas, thyroïde, etc...) (Hart and McKenzie, 1990). Dans les sections suivantes A2 et A3, nous présenterons une caractérisation plus complète des CL et des DC du derme (Figure 1).

2. Les cellules de Langerhans

Décrites en 1868 dans l'épiderme par Paul Langerhans (Langerhans, 1868), les CL furent longtemps considérées comme des cellules appartenant au système nerveux par leur forte affinité aux colorations par des sels d'or, leur morphologie dendritique et leur continuité avec les fibres nerveuses du derme. Cette affiliation fut maintenue jusque dans les années 70 où elles ont été définitivement considérées comme des DC. Les CL sont caractérisées *in situ* par la présence d'extensions cytoplasmiques longues et fines émergeant de corps cellulaires de petite taille (Figure 2). L'utilisation de méthodes histo-chimiques (sels d'or) et histo-enzymatiques (ATPase ou myéloperoxydase) a permis de les localiser dans les couches basales et suprabasales de l'épiderme. Les CL représentent de 1 à 5 % des cellules épidermiques avec une densité de 100 à 1100 CL au mm² (Chen et al., 1985). Par ailleurs, elles possèdent un noyau plurilobé entouré d'un cytoplasme clair dépourvu de tonofilaments, de desmosomes et de mélanosomes. Les CL possèdent un organite intracytoplasmique unique permettant de les identifier avec certitude : le granule de Birbek (BG) (Birbeck et al., 1961). Il se présente sous la forme d'un bâtonnet rectiligne ou incurvé ou sous forme dite « en raquette de tennis » lorsque l'une des extrémités est en continuité avec une vésicule. Le BG est formé par deux membranes accolées séparées par une zone régulièrement striée en « fermeture éclair » (Figure 3). La lectine de type C langerin, marqueur spécifique des CL, est préférentiellement associée aux BG et intervient dans leur biogénèse (Valladeau et al., 2000). En effet, la présence des BG peut d'ailleurs être détectée par l'anticorps anti-Lag (*Langerhans Associated Granules*), reconnaissant un épitope intracellulaire de la langerin (Kashihara et al., 1986). Par ailleurs, la transfection de fibroblastes avec un ADN codant pour la langerin induit la formation d'un réseau dense de structures présentant les caractéristiques des BG (Valladeau et al., 2000).

En accord avec leur appartenance à la population des DC, les CL expriment CD45 et les marqueurs myéloïdes CD13 et CD33 et sont négatives pour les marqueurs de lignage (Figure 4). Les CL expriment tous les composants de la machinerie de présentation antigénique : les CMH de classe I et II et la chaîne invariante Ii/CD74. Elles expriment également CD1a (absent chez les CL de souris), impliqué dans la présentation d'antigènes glycolipidiques, CD1b et c mais pas CD1d (De Panfilis et al., 1988; Elder et al., 1993; Ronger-Savle et al., 2005). La molécule d'adhérence E-Cadhérine, exprimée par les kératinocytes, est également présente à la surface des CL (Blauvelt et al., 1995). Par ailleurs, les CL expriment des intégrines de la famille $\beta 1$ ($\alpha 1$ à $\alpha 6$) (Le Varlet et al., 1991) et des intégrines de la famille $\beta 2$ (De Panfilis et al., 1989). Des molécules d'adhérence spécifiques pour le contact avec les lymphocytes sont également exprimées par le CL : ICAM-1/CD54, ICAM-3/CD50, LFA-3/CD58 (De Panfilis et al., 1990; De Panfilis et al., 1991).

3. Les cellules dendritiques dermiques

Le derme, tissu conjonctif dense et fibro-élastique est constitué en majorité par des fibroblastes mais contient en plus de nombreux autres types cellulaires résidents ou transitoires: des cellules endothéliales formant le réseau vasculaire, des cellules nerveuses, et des cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes T, mastocytes et DC). Contrairement à leurs homologues épidermiques, les cellules dendritiques dermiques (DDC) sont peu étudiées, la complexité structurale et cellulaire du tissu dermique ne facilitant pas leur isolation et leur identification.

Au début des années 1990, une nouvelle population cellulaire résidant dans le derme a été mise en évidence par immuno-histochimie (Cerio et al., 1989; Sontheimer et al., 1989; Derrick et al., 1993). Ces cellules de forme dendritique expriment le facteur intracytoplasmique de coagulation XIIIa (facteur XIIIa) ainsi que le CMH de classe II. Ces cellules ont été dénommées « dendrocytes dermiques», terme initialement proposé par J. Headington pour décrire des cellules du derme possédant des activités enzymatiques (ATPase, lysozyme ou phosphate acide, entre autres) permettant de les distinguer des fibroblastes (Headington, 1986). Les DDC présentent toutes les caractéristiques morphologiques des DC : fins prolongements cytoplasmiques et noyau plurilobé. Par ailleurs, l'absence de BG et de marquage Lag, spécifique des CL, confirment que ces cellules ne sont pas des CL ayant migré au sein du derme (Lenz et al., 1993; Katou et al., 2000).

Afin de caractériser au mieux ces cellules, deux techniques ont été utilisées. La première méthode utilise une **suspension de derme humain** digéré enzymatiquement et des triples marquages en cytométrie en flux (Meunier et al., 1993), alors que la seconde utilise des **cellules ayant émigré d'explants de derme humain** (Lenz et al., 1993; Nestle et al., 1993; Larregina et al., 2001). De manière intéressante, selon la technique utilisée pour l'étude des DDC, les données obtenues sont parfois divergentes. D'une part, Meunier et coll. démontrent qu'au sein de la population cellulaire du derme, 25 à 45% des cellules expriment HLA-DR et CD45 (Meunier et al., 1993) tandis que les DC émigrantes de Nestlé et coll. expriment toutes fortement HLA-DR et CD45 et constitutivement CD1c et le facteur XIIIa (Nestle et al., 1993). Meunier et coll. définissent plus particulièrement l'existence de deux populations HLA-DR positives selon l'expression de CD11c et CD1c : la première CD11c^{fort} co-exprime CD1c et CD1a ainsi que le facteur XIIIa, la seconde CD11c^{faible} est négative pour CD1c et exprime CD36 (Meunier et al., 1993). L'existence de ces deux populations a par ailleurs été confirmée par les travaux de Gonzalez-Ramos et coll. qui définissent alors la population HLA-DR⁺ CD1c⁻ CD11b^{faible} comme une population de macrophages (Gonzalez-Ramos et al., 1996). La population HLA-DR⁺ CD1c⁺ CD1a⁺ CD11c^{fort} représenterait alors la population de DDC. D'autre part, l'expression des molécules CD40, CD80, CD83 et CD86 diffère également selon la technique utilisée. En effet, l'expression de ces molécules est significativement augmentée dans les DDC issues de migration, révélant qu'elles sont déjà entrées dans un processus d'activation induit lors de leur migration hors de l'explant (McLellan et al., 1998; Furio et al., 2005). Par ailleurs, une dichotomie dans l'expression de CD1a et CD14 a été retrouvée dans certaines études utilisant des DC migrantes et fraîchement isolées: la première sous-population des DDC est CD1a⁺ CD14⁻, la seconde est CD1a⁻ CD14⁺ (Nestle et al., 1993; Turville et al., 2002; Angel et al., 2006).

Les DDC expriment CD1d, CD32 ainsi que certains récepteurs d'adhésion et de co-stimulation tels que CD54 et CD18 ([Figure 4](#)). De plus, aucune expression de marqueurs spécifiques des cellules endothéliales, tels que VCAM-1 ou E-Selectin (ELAM-1), n'a été détectée (Nestle et al., 1993; Larregina et al., 1997; Gerlini et al., 2001). Enfin, les DDC expriment les lectines de type C MMR (*Mannose Macrophage Receptor*) et ASGPR/mMGL (*ASialioGlycoProtein receptor/Macrophage Galactose/N-acetylgalactosamine-specific C-type Lectin murine*) (Valladeau et al., 2001; van Vliet et al., 2006). Elles expriment également la lectine DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Nonintegrin*) (Geijtenbeek et al., 2000b).

Cependant, les travaux de Turville et coll. démontrent que DC-SIGN n'est exprimé que sur la population CD1a^{faible} CD14⁺ et est absent sur la population CD1a^{fort} CD14⁻ alors que le MMR est retrouvé sur les deux populations bien que plus fortement sur les cellules CD1a^{fort} CD14⁻ (Turville et al., 2002).

4. Origine et différenciation des cellules dendritiques cutanées

a. Origine des cellules dendritiques cutanées

a.1. *Chez l'homme*

Chez l'homme, peu de travaux ont été réalisés pour déterminer l'origine des DC cutanées et ceux-ci concernent principalement les CL. L'origine médullaire des CL a été établie par l'étude de femmes ayant reçu une greffe de moelle osseuse de donneurs masculins qui présentent des CL porteuses du chromosome Y (Pelletier et al., 1984). Par ailleurs, les travaux de Larregina et coll. ont identifié une population précurseur de CL dans le derme. En effet, à partir de cellules émigrantes de peau totale, une forte population CD14⁺ CD1a⁻ (25-35 %), distincte des monocytes CD14⁺ du sang périphérique et exprimant la langerin, a été isolée. Cette population achève sa différenciation en CL en présence de TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor- β 1*) et, de par son expression de CCR6, posséderait la capacité à migrer vers l'épiderme en réponse au MIP-3 α sécrété par les kératinocytes. Cette population représenterait, d'après ces travaux, un pool de précurseurs de CL qui pourrait repeupler l'épiderme en cas de déplétion en CL (Larregina et al., 2001). Dans ce même ordre d'idée, Schaerli et coll. démontrent, dans un modèle d'épiderme reconstruit, que des cellules CD14⁺ dérivées de monocytes ou de précurseurs hématopoïétiques CD34⁺ peuvent être recrutées dans l'épiderme *via* CXCL14 puis se différencier en CL au sein de l'épiderme reconstruit (Schaerli et al., 2005).

L'origine des DDC reste, à l'heure actuelle, toujours inconnue. Cependant, les travaux de G. Randolph suggèrent que les DC pourraient avoir une origine monocyttaire. Ils ont, en effet, démontré la capacité de monocytes humains à se différencier en DC en utilisant un système de migration cellulaire à travers une monocouche de cellules endothéliales (Randolph et al., 1998; Randolph et al., 2002).

a.2. Chez la souris

La grande majorité des études visant à déterminer les origines des DC utilise des modèles animaux et plus particulièrement des modèles murins. Les études chez la souris ont en particulier permis d'établir que toutes les DC ont pour origine des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse (Steinman et al., 1974; Katz et al., 1979). Initialement, il a été suggéré l'existence de DC d'origine myéloïde et de DC d'origine lymphoïde. En effet, il a été ainsi démontré que les DC se développent *in vivo* à partir d'un précurseur myéloïde commun (Inaba et al., 1993). Par ailleurs, les travaux du groupe de K. Shortman ont également démontré l'existence de précurseurs lymphoïdes aux DC et ont établi que ceux-ci génèrent les DC CD8⁺, tandis que les précurseurs myéloïdes génèrent les DC CD8⁻ (Ardavin et al., 1993). Depuis, des études ont montré que les progéniteurs communs lymphoïdes et myéloïdes peuvent se différencier à la fois en DC CD8⁺ et en DC CD8⁻ (Traver et al., 2000; Manz et al., 2001). Les systèmes de différenciation des DC *in vivo*, si complexes, font encore l'objet de nombreuses études, beaucoup de voies restant encore à découvrir (Shortman and Naik, 2007).

Le développement des CL *in vivo* est également complexe et encore méconnu. Les travaux, chez la souris, du groupe de M. Merad ont démontré, qu'en conditions normales, les CL ayant migré hors de l'épiderme sont remplacées *in situ* soit par la prolifération de CL de l'épiderme soit par des précurseurs présents dans la peau qui recolonisent l'épiderme. Au contraire, en conditions inflammatoires, la forte déplétion épidermique des CL serait restaurée par le recrutement de précurseurs sanguins (Merad et al., 2002). Ces précurseurs ont été très récemment caractérisés par ce même groupe. Ginhoux et coll. démontrent en effet que les monocytes GR-1^{fort} sont recrutés dans l'épiderme puis prolifèrent pendant 3-4 jours avant de se différencier en CL langerin⁺ en 2 à 3 semaines (Ginhoux et al., 2006). De manière similaire, la restauration des DC du derme a lieu d'une part en condition normale par la prolifération *in situ* d'une population de DC dermique radio-résistante proliférative, et d'autre part en conditions inflammatoires par des précurseurs circulants sanguins toujours non identifiés (Bogunovic et al., 2006).

b. Génération *in vitro* de cellules dendritiques humaines

L'étude des DC a longtemps été limitée par la difficulté d'obtenir ces cellules *ex vivo* à partir de tissu humain. Dès lors, les systèmes de culture *in vitro* des DC, permettant d'obtenir

des DC phénotypiquement et fonctionnellement très proches de celles observées *in situ*, ont largement contribué à l'avancée des connaissances sur les DC. Par ailleurs, ces études *in vitro* ont permis de caractériser des facteurs de croissance essentiels à la génération des DC humaines.

*b.1. Génération de cellules dendritiques à partir de progéniteurs
hématopoïétiques CD34⁺*

En 1992, Caux et coll. démontrent que les progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ issus de sang de cordon ombilical sont capables de se différencier en CL en présence de GM-CSF (*Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*) et de TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*) (Caux et al., 1992). A un stade précoce de différenciation (entre 5 et 7 jours de culture) de ces progéniteurs émergent deux sous populations de précurseurs : une population CD1a⁺ CD14⁻ et une population CD1a⁻ CD14⁺. Après 12 à 14 jours de culture, ces deux populations se différencient en deux populations de DC distinctes : la population CD1a⁺ CD14⁻ génère des CL (BG⁺ Lag⁺ E-Cadhérine⁺ CD83⁺ CD86⁺), tandis que la population CD1a⁻ CD14⁺ se différencie en DC exprimant des marqueurs de DC dermique (facteur XIIIa, CD11b et CD36) (Caux et al., 1996a). D'autres études ont également détaillé la différenciation de DC à partir de progéniteurs CD34⁺ de moelle osseuse ou de sang périphérique d'adulte (Reid et al., 1992; Strunk et al., 1996).

De nombreuses combinaisons cytokiniques alternatives ont été ensuite utilisées pour la génération des CL et des DC. Les DC interstitielles peuvent être obtenues par l'addition d'IL-4 au GM-CSF et au TNF- α . Cette association oriente dans la voie de différenciation interstitielle et inhibe la différenciation en macrophages (Rosenzwajg et al., 1996; Strunk et al., 1996; Caux et al., 1999). L'IL-13, ayant des propriétés similaires à l'IL-4, a également été utilisée (Rosenzwajg et al., 1998). Les CL, quant à elles, sont majoritairement générées avec du TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor*), dont le rôle primordial dans la différenciation des CL a été démontré par l'étude de souris déficientes en TGF- β 1 qui sont dépourvues de CL (Borkowski et al., 1996). En effet, la combinaison GM-CSF et TGF- β 1 induit l'orientation directe des progéniteurs CD34⁺ mais également celle des précurseurs CD1a⁻ CD14⁺ dans la voie de différenciation langerhansienne (Caux et al., 1999; Jaksits et al., 1999). Enfin, l'addition de SCF (*Stem Cell Factor*), ligand de c-kit, de Flt3-ligand (*fms-like tyrosine kinase-3 ligand*), ou de thrombopoïétine dans ces cultures induit une très forte expansion des

progéniteurs CD34⁺ et ainsi le nombre de DC obtenues (Szabolcs et al., 1995; Siena et al., 1995; Rosenzweig et al., 1998; Arrighi et al., 1999).

b.2. Génération de cellules dendritiques à partir de monocytes

L'abondance des monocytes dans le sang périphérique humain et leur accessibilité a amené de nombreux groupes à générer *in vitro* des DC à partir de monocytes. Contrairement aux progéniteurs CD34⁺, les monocytes se différencient, sans proliférer, en 4 à 6 jours de culture en présence de GM-CSF et d'IL-4 (Romani et al., 1994; Sallusto and Lanzavecchia, 1994), d'IL-13 (Piemonti et al., 1995) ou d'IFN α (Interféron α) (Paquette et al., 1998). Ces DC, CD1a⁺ CD14⁺, nommées MoDC, présentent toutes les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des DC immatures et sont similaires à la sous-population CD14⁺ obtenue à partir de progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺. Par ailleurs, elles possèdent encore la capacité à se différencier en macrophages en présence de M-CSF (*Monocyte-Colony Stimulating Factor*) (Palucka et al., 1998). En revanche, après stimulation par du LPS (Lipopolysaccharide), du TNF- α /IL-1 β , elles sont irréversiblement engagées dans la voie de différenciation des DC (Palucka et al., 1998). Les travaux de G. Randolph ont confirmé la capacité des monocytes humains à se différencier en DC dans un modèle de migration cellulaire à travers un endothélium cultivé sur gel de collagène (Randolph et al., 1998; Randolph et al., 2002).

Les monocytes peuvent également se différencier en CL *in vitro* sous l'action combinée de GM-CSF, d'IL-4 et de TGF- β 1 (Geissmann et al., 1998) ou de GM-CSF, d'IL-13 et de TGF- β 1 (Bechemtoille et al., 2003). Cependant, les CL générées en GM-CSF/TGF- β 1/IL-4 ou IL-13 n'acquièrent un phénotype de CL complet (forte expression en surface de langerin et présence de BG) qu'après une brève stimulation par le TNF- α (Bechemtoille et al., 2003). D'autre part, une autre combinaison cytokinique (GM-CSF et IL-15) a été décrite et permet de générer des CL, langerin⁺ BG⁻, CL plutôt activées ou peu différenciées (Mohamadzadeh et al., 2001). Enfin, Notch-1 ligand, régulateur de la différenciation des monocytes en DC, favorise également la différenciation de monocytes cultivés GM-CSF/TGF- β 1 en CL (Hoshino et al., 2005).

B. Reconnaissance des signaux de danger

Comme précédemment décrit dans la section A « Phénotype des cellules dendritiques », les DC expriment de nombreux récepteurs, qui peuvent être impliqués dans diverses fonctions et en particulier dans la reconnaissance et l'internalisation d'antigènes.

Charles Janeway et Ruslan Medzhitov ont émis l'hypothèse que les mécanismes de défense innée sont déclenchés par des récepteurs capables de reconnaître des motifs présents uniquement sur les pathogènes (Medzhitov and Janeway, 1997). Ces motifs ont été appelés **PAMP** pour « *Pathogen Associated Molecular Pattern* ». Les PAMP sont des structures relativement invariantes, présentes sur les micro-organismes mais absentes chez l'hôte et communes à de nombreuses classes de micro-organismes. Contrairement à cette approche basée sur la discrimination entre les éléments infectieux et éléments non infectieux, Polly Matzinger a développé une autre théorie, la **théorie du danger**. Dans ce système, les PAMP mais aussi les signaux dérivés de tissus ou cellules endommagés activent les APC (Matzinger, 2002).

Les récepteurs capables de reconnaître ces motifs et signaux de danger ont été regroupés sous le terme *Pattern Recognition Receptors* (**PRR**) (Medzhitov and Janeway, 2002). Certains PRR sont uniquement impliqués dans la capture et l'endocytose de pathogènes et d'antigènes, tandis que d'autres peuvent conduire en plus à l'activation cellulaire. Parmi ces PRR sont retrouvés les lectines de type C, les récepteurs *scavengers*, les récepteurs *Toll-Like* (TLR), les récepteurs *RIG-Like* (RLR) ou encore les récepteurs *NOD-Like* (NLR).

1. Les lectines de type C

Les lectines de type C sont des protéines caractérisées par la présence d'un ou plusieurs domaines de reconnaissance des carbohydrates (CRD) dont l'activité est dépendante du calcium. En fonction d'une séquence particulière en acides aminés, les CRD se divisent en deux classes, l'une lie préférentiellement des résidus de type mannose et fucose et l'autre préférentiellement des résidus de type galactose (Drickamer, 1999).

La famille des lectines de type C présente une très grande diversité, tant structurale que fonctionnelle. Elle regroupe à la fois des protéines solubles, collectines et protéoglycanes, et des protéines transmembranaires. Parmi ces protéines transmembranaires sont retrouvés des récepteurs spécifiques aux lymphocytes T et aux cellules NK (CD94, Ly-49, NKG2), des récepteurs impliqués dans l'adhésion cellulaire (les sélectines L, E et P) ainsi que de

récepteurs d'endocytose tels que MMR (protéine de type I) ou DC-SIGN et langerin (protéines de type II). Nous détaillerons ici uniquement les caractéristiques des lectines suivantes : MMR, DC-SIGN, langerin, LSECTin et Dectin-1, dont le rôle dans la reconnaissance de pathogènes a été clairement défini ([Figure 5](#)).

a. Récepteur du mannose des macrophages

Le récepteur du mannose des macrophages (MMR/CD206) est une lectine de type I comportant huit CRD. Malgré sa dénomination, MMR est également exprimé par les DC (Engering et al., 1997; Kato et al., 2000; Turville et al., 2002). MMR peut lier de nombreux pathogènes tels que *Candida albicans* (Ezekowitz et al., 1990), *Pneumocystis carinii* (Ezekowitz et al., 1991) ou encore *Streptococcus pneumoniae* (Zamze et al., 2002). Par ailleurs, il a été démontré chez l'homme que MMR peut reconnaître des composés endogènes modifiés tels que des immunoglobulines présentant des altérations de la glycosylation, retrouvées dans certaines maladies auto-immunes (Dong et al., 1999). De plus, une récente étude utilisant des DC issues de souris MMR^{-/-} démontre que MMR jouerait un rôle particulièrement important dans la présentation croisée d'antigènes solubles (Burgdorf et al., 2006).

b. DC-SIGN et Langerin

DC-SIGN/CD209 (*Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Nonintegrin*) est une lectine de type II comportant un unique CRD à forte spécificité pour le mannose. Dans sa partie intracytoplasmique DC-SIGN possède trois motifs d'internalisation (un motif di-leucine, une triade d'acides amines EEE et un motif tyrosine) (Figdor et al., 2002). Bien que majoritairement exprimé par les DC interstitielles (Geijtenbeek et al., 2000b; Jameson et al., 2002; Ebner et al., 2004), son expression est également retrouvée sur certaines populations de macrophages (alvéolaires, déciduaux ou médullaires) (Soilleux et al., 2002; Granelli-Piperno et al., 2005). DC-SIGN a été initialement identifié pour sa capacité à lier le VIH (Curtis et al., 1992). Depuis, il a été démontré qu'il interagit avec une pléthore de pathogènes dont des virus (le virus de la dengue, de l'hépatite C ou Ebola) (Alvarez et al., 2002; Pohlmann et al., 2003; Tassaneeritthep et al., 2003), des bactéries telles que *Mycobacterium tuberculosis* (Geijtenbeek et al., 2003), des levures telles que *Candida albicans* (Cambi et al., 2003) et bien d'autres encore (parasites, protozoaires).

En plus de sa fonction de récepteur d'endocytose, les travaux de l'équipe de T. Geijtenbeek ont établi que DC-SIGN agit également comme récepteur d'adhésion en démontrant qu'il se lie avec une grande affinité à ICAM-2 permettant la transmigration (migration à travers un endothélium par exemple) et le trafic des DC (Geijtenbeek et al., 2000a) et qu'il lie également ICAM-3 (d'où son nom) permettant de stabiliser le contact entre la DC et le lymphocyte T nécessaire à l'engagement du récepteur des lymphocytes T (TCR) (Geijtenbeek et al., 2000c).

Exprimée spécifiquement par les CL, la langerin/CD207 est une lectine de type II. Elle contient dans sa partie intracytoplasmique une séquence riche en proline (Valladeau et al., 1999; Valladeau et al., 2000). Son CRD présente une spécificité de type mannose (Stambach and Taylor, 2003). Par ailleurs, elle reconnaît la glycoprotéine d'enveloppe gp120 du VIH (Turville et al., 2002; de Witte et al., 2007) ainsi que des levures telles que *Candida albicans* (Takahara et al., 2004).

c. LSEctin

LSEctin (*liver and lymph node sinusoidal endothelial cell type lectin*) est une nouvelle lectine de type C caractérisée en 2004 dans les cellules endothéliales sinusoidales du foie et des ganglions lymphatiques (Liu et al., 2004). Son expression a récemment été retrouvée sur les mDC du sang et les DC thymiques humaines ainsi que sur les MoDC (Dominguez-Soto et al., 2007). De manière très intéressante, LSEctin est impliqué dans la liaison et dans l'internalisation de virus tels que les filovirus (Ebola) ou les coronavirus (virus du SRAS, Syndrome Respiratoire Aigu Sévère) alors qu'il ne reconnaît ni le VIH, ni le virus de l'hépatite C (Gramberg et al., 2005; Dominguez-Soto et al., 2007).

d. Dectin-1

Dectin-1 est une lectine de type II. Identifié au préalable sur les DC murines de la rate et les DC du sang humain (Ariizumi et al., 2000; Yokota et al., 2001), Dectin-1 est fortement exprimé par les macrophages mais également par les monocytes et les neutrophiles ainsi que sur certaines populations de lymphocytes T chez l'homme et chez la souris (Taylor et al., 2002; Willment et al., 2005). Dectin-1 reconnaît des β -glucans, composés présents à la surface des champignons (Brown and Gordon, 2001; Brown et al., 2002). Dectin-1 lie directement des levures telles que *Candida albicans* mais uniquement sous leur forme sporulée (Gantner et al.,

2005). De récentes études *in vivo* ont établi le rôle primordial de Dectin-1 dans l'immunité anti-fongique : en effet, les souris déficientes en Dectin-1 présentent une réponse immunitaire anti-fongique fortement altérée (Saijo et al., 2007; Taylor et al., 2007).

Dectin-1 possède dans sa partie intracytoplasmique un domaine ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) qui lui confère la capacité à induire des cascades de signalisation, activatrices de la production de cytokines inflammatoires. Les travaux de l'équipe de C. Reis e Sousa ont étudié les voies de signalisation induite par l'activation de Dectin-1 chez la souris. La liaison du zymozan à Dectin-1 entraîne la phosphorylation de Syk puis de ERK induisant alors la production d'IL-2 et d'IL-10 (Rogers et al., 2005; Slack et al., 2007). Au contraire, la voie signalisant *via* Syk et CARD9 (*CAspase Recruiting Domain*) (après liaison avec *Candida albicans* ou le Curdlan) induit la maturation des DC, la synthèse d'IL-6 et IL-23 puis l'activation de la différenciation de LT de type Th1 producteurs d'IFN γ et de type Th17 producteurs d'IL-17 (Leibundgut-Landmann et al., 2007). Le Curdlan est un β -glucan spécifique de Dectin-1, utilisé en remplacement du zymozan, afin de prévenir l'activation potentielle de TLR2 par le zymozan. Par ailleurs, une récente étude a démontré l'interaction de Dectin-1 avec la tétraspanine CD37. La synthèse d'IL-6 induite par l'activation de Dectin-1 par le Curdlan serait régulée par CD37 (Meyer-Wenttrup et al., 2007).

2. Les récepteurs *scavengers*

Contrairement à la famille des lectines de type C dont les membres sont regroupés par leur homologie structurale, les récepteurs *scavengers* (SR) ont été initialement regroupés selon leur capacité à lier des lipoprotéines de faible densité (*Low Density Lipoprotein*, LDL) oxydées ou acétylées (ox ou ac LDL) (Goldstein et al., 1979). Les SR lient également une très grande diversité d'autres molécules (bactériennes, virales ou endogènes) caractérisées par leur nature polyanionique (Gough and Gordon, 2000). Les premières descriptions de ces récepteurs et de leur activité ont été faites chez les macrophages dans des phénomènes d'athérosclérose. Depuis, l'expression des SR a été décrite dans d'autres types cellulaires tels que les DC. Cependant, la grande majorité des travaux sur les SR a été réalisée sur des macrophages et utilise des modèles murins ou des lignées transfectées. De plus, bien que la recherche actuelle concernant les SR se soit considérablement accrue, la majorité des études reste exclusivement effectuée par quelques équipes de recherche et est rarement confirmée par d'autres. La famille des SR est composée de récepteurs ayant des structures très

hétérogènes appartenant à six classes différentes, organisées en fonction de leur domaines structuraux (Krieger, 1997) (Figure 6).

a. SRA

Le récepteur scavenger A, récepteur scavenger type, fut le premier à être identifié (Kodama et al., 1990). SR-A existe sous trois isoformes : SR-A I (contenant un domaine riche en cystéines) et SR-A II qui sont des récepteurs transmembranaires alors que SR-A III est non fonctionnel et non exprimé à la membrane plasmique (Gough et al., 1998). SR-A est exprimé par les macrophages ainsi que par les DC murines, simiennes et humaines (Harshyne et al., 2003; Becker et al., 2006; Amiel et al., 2007). SR-A est impliqué dans de nombreuses fonctions biologiques en sus de la reconnaissance des oxLDL (Platt and Gordon, 2001). Il intervient chez la souris dans la phagocytose de bactéries Gram⁺ et Gram⁻ et dans la liaison de motifs CpG d'ADN bactérien (Dunne et al., 1994; Zhu et al., 2001; Peiser et al., 2002; Amiel et al., 2007). Par ailleurs des études, utilisant soit des lignées cellulaires transfectées avec SR-A, soit des souris SR-A^{-/-}, ont établi la capacité de SR-A à lier des protéines endogènes telles que les protéines de choc thermique (*Heat Shock Protein*) hsp110, grp170, la gp96 et la calréticuline (Berwin et al., 2003; Facciponte et al., 2007). D'autre part, SR-A est impliqué dans la présentation antigénique : en effet, *in vitro* SR-A permet la présentation d'ox-LDL à des lymphocytes T CD4⁺ et également la présentation croisée d'antigènes tumoraux associés à hsp110 (Nicoletti et al., 1999; Facciponte et al., 2007). Enfin, les travaux chez le macaque du groupe de L. Harshyne montrent que les DC *via* leur expression de SR-A peuvent, *in vitro*, capturer des fragments de membranes de cellules tumorales vivantes par un surprenant mécanisme dit de « *nibbling* » (Harshyne et al., 2003).

b. MARCO

Bien qu'appartenant à la classe A des SR, MARCO (*Macrophage Receptor with Collagenous Structure*) possède en plus des autres SR un large domaine collagène (Elomaa et al., 1995; Elomaa et al., 1998). L'expression de MARCO est restreinte aux macrophages (Elshourbagy et al., 2000; van der Laan et al., 1999). Cependant, bien qu'absent chez les DC immatures, l'ARN messager de MARCO est détecté chez les DC matures de la souris (Granucci et al., 2001; Grolleau et al., 2003). De même, lors d'une infection bactérienne, l'expression constitutive de MARCO est augmentée dans les macrophages murins de nombreux tissus *in vivo* et *in vitro* (van der Laan et al., 1999). MARCO lie des bactéries Gram⁺

et Gram⁻ (Elomaa et al., 1998; Elshourbagy et al., 2000; Sankala et al., 2002). Par ailleurs, il semble être le récepteur majoritaire impliqué dans la liaison de certains microorganismes et particules environnementales inertes telles TiO₂ par les macrophages alvéolaires du poumon (Arredouani et al., 2004; Arredouani et al., 2005). MARCO, exprimé par les macrophages alvéolaires, jouerait un rôle important dans la régulation de l'inflammation pulmonaire en éliminant les lipides oxydés présents dans les fluides bronchioalvéolaires générés par l'exposition à l'ozone (Dahl et al., 2007). Enfin, d'autres travaux *in vitro*, utilisant principalement la lignée murine de DC D1 ou des cellules transfectées, proposent que MARCO soit impliqué dans le réarrangement du cytosquelette d'actine (Pikkarainen et al., 1999; Granucci et al., 2003). Très curieusement, les DC immatures de la lignée D1 transfectées par MARCO présenteraient une morphologie de DC matures et leur capacité à internaliser *Escherichia coli* serait diminuée (Granucci et al., 2003).

c. CLA-1/SR-BI

CLA-1 (chez l'homme) ou SR-BI (chez les rongeurs) appartient à la classe B des SR et présente une forte homologie à CD36, autre membre de cette classe (Acton et al., 1994; Murao et al., 1997). CLA-1/SR-BI est abondamment retrouvé dans les tissus au métabolisme élevé du cholestérol (foie, ovaires, testicules) compte tenu de son rôle dans l'endocytose des HDL (*High Density Lipoprotein*) (Acton et al., 1996; Calvo et al., 1997; Murao et al., 1997). Il est également exprimé par les monocytes, et par les DC et les macrophages humains générés *in vitro* (Buechler et al., 1999). CLA-1 a été décrit comme récepteur de la glycoprotéine E2 du virus de l'hépatite C (Scarselli et al., 2002; Bartosch et al., 2003; Voisset et al., 2005). Par ailleurs, il intervient dans la liaison et l'internalisation des composés bactériens LPS et LTA et de bactéries comme *Escherichia coli* ou *Staphylococcus aureus* (Vishnyakova et al., 2003; Bocharov et al., 2004; Vishnyakova et al., 2006).

d. LOX-1

LOX-1 (*Lectin-like oxidized Lox-density lipoprotein receptor 1*) est une glycoprotéine de type II comportant un domaine *lectine like* et appartient à la classe E des SR (Sawamura et al., 1997). L'expression de LOX-1 est retrouvée sur les macrophages et sur les DC immatures (Yoshida et al., 1998; Delneste et al., 2002). LOX-1 possède un large spectre de ligands, en particulier des bactéries Gram⁺ et Gram⁻ (Shimaoka et al., 2001), des cellules apoptotiques (Oka et al., 1998; Murphy et al., 2007) ou encore des protéines de choc thermique (Delneste et

al., 2002). Par ailleurs, l'équipe de Jeannin et coll. a démontré que LOX-1 intervient *in vitro* dans la présentation croisée, par les DC, d'ovalbumine (OVA) associée à la protéine chaperonne hsp70. Par ailleurs, dans un modèle murin de tumeur exprimant OVA, ils démontrent que l'injection d'un anticorps anti-LOX-1 couplé à OVA prévient la croissance de ces tumeurs murines. Ainsi, *in vivo*, le ciblage d'antigènes tumoraux à LOX-1 induit une réponse cytotoxique anti-tumorale protectrice (Delneste et al., 2002).

e. SREC-I

Appartenant à la classe F des SR, SREC-I (*Scavenger Receptor Expressed by endothelial Cells*), identifié à partir de cellules endothéliales humaines (Adachi et al., 1997), est exprimé dans de nombreux tissus ainsi que par les macrophages dont l'expression est augmentée par stimulation par le LPS (Tamura et al., 2004). De plus, comme SR-A, en utilisant des lignées transfectées, il a été récemment défini comme récepteur d'endocytose de calréticuline soluble et de protéines de choc thermique telles que hsp110 et grp170 (Berwin et al., 2004; Facciponte et al., 2007). Le potentiel rôle de SREC-I dans la présentation croisée d'antigènes tumoraux complexés à hsp110 ou grp170 est en cours d'étude (Facciponte et al., 2007).

f. SR-PSOX/CXCL16

SR-PSOX (*Scavenger Receptor that binds PhosphatidylSerine and Oxidized lipoprotein*) cloné en 2000, a également été identifié à cette époque comme CXCL16, ligand du récepteur CXCR6/Bonzo (Matloubian et al., 2000; Shimaoka et al., 2000). SR-PSOX/CXCL16 existe sous forme de récepteur transmembranaire ou de protéine soluble sécrétée (Matloubian et al., 2000). Son expression par les mDC et pDC humaines est augmentée après maturation par différents stimuli (Tabata et al., 2005). Les études chez l'homme, utilisant principalement des lignées transfectées et des MoDC, établissent que SR-PSOX/CXCL16 posséderait trois activités biologiques distinctes. Premièrement, il reconnaît et phagocyterait des bactéries Gram⁻ et Gram⁺ telles que *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (Shimaoka et al., 2003). De plus, il lierait des CpG ODN de type D et l'inactivation par un anticorps anti-SR-PSOX/CXCL16 bloquerait la production d'IFN α induite par l'activation de TLR9 par ces CpG (Gursel et al., 2006). Enfin, il permettrait l'adhésion aux lymphocytes T CXCR6⁺ (Shimaoka et al., 2004) et cette interaction avec CXCR6 stimulerait la réponse T mémoire effectrice (Tabata et al., 2005).

3. Les récepteurs *Toll-Like*

Le premier membre de la famille des récepteurs *Toll* a été initialement décrit chez la drosophile au cours du développement embryonnaire. Aujourd'hui, douze récepteurs *Toll-Like* (TLR) ont été identifiés chez la souris (TLR 1-9 et 11-13) et dix chez l'homme (TLR 1-10). Les TLR sont des protéines transmembranaires de type I caractérisées par un domaine extracellulaire riche en leucine (*Leucine Rich Repeat*, LRR) impliqué dans la reconnaissance des motifs PAMP et un domaine intracellulaire homologue à celui du récepteur de l'IL-1, appelé domaine TIR (pour Toll/IL-1 Récepteur) nécessaire à la transduction du signal (Figure 7).

a. Expression des TLR par les cellules dendritiques

L'expression des TLR a été principalement définie par la détection d'ARN messagers (ARNm), peu d'anticorps étant disponibles. Certains TLR sont exprimés à la surface cellulaire (TLR1, 2, 4, 5 et 6) tandis que d'autres sont retrouvés exclusivement au sein de compartiments intracellulaires (TLR3, 7, 8 et 9).

Le profil d'expression des TLR est différent pour chaque population de DC (Figure 8) (Jarrossay et al., 2001; Kadowaki et al., 2001; Visintin et al., 2001; Hornung et al., 2002; Means et al., 2003; Hoene et al., 2006). En effet, les mDC CD11c⁺ du sang humain expriment fortement TLR1, TLR2, TLR3 et TLR8 et plus faiblement TLR5, TLR6, et TLR10, tandis que les pDC expriment TLR1 et TLR6, faiblement TLR10 et fortement TLR7 et 9. Les DC générées *in vitro* à partir de monocytes expriment presque tous les TLR excepté TLR7.

Quelques travaux rapportent l'expression des TLR par les DC cutanées humaines. Les travaux de Takeuchi et coll. et Van der Aar et coll., utilisant des CL générées à partir de monocytes, établissent que les CL expriment majoritairement les ARNm des TLR1, 3 et 8, faiblement ceux de TLR2, 6 et 7 et pas ceux de TLR4, 5, 9 et 10. L'absence de TLR4 est confirmée par l'absence de réponse après activation par le LPS, ligand de TLR4 (Takeuchi et al., 2003; van der Aar et al., 2007). Au contraire, l'expression des TLR par des CL générées à partir de précurseurs hématopoïétiques CD34⁺ diffère : les CL expriment les ARNm de tous les TLR avec notamment une forte expression de TLR2 et une expression plus modérée de TLR3, 4, 8 et 10 (Renn et al., 2006). Quant aux CL et DDC fraîchement isolées de peau humaine, une seule étude a défini leur profil d'expression des TLR : les CL exprimeraient

fortement les ARNm de TLR1, 3, 6 et 7, pas ou peu ceux de TLR2, 4, 5 et 8. Les DDC, quant à elles, exprimeraient tous les TLR exceptés TLR9 et TLR 10 (van der Aar et al., 2007).

Par ailleurs, certains TLR sont exprimés par de nombreuses autres cellules immunitaires dont les monocytes, les NK, les neutrophiles, des lymphocytes B et T (Muzio et al., 2000; Hornung et al., 2002; Iwasaki and Medzhitov, 2004; Reis e Sousa, 2004). Enfin, l'expression des TLR n'est pas restreinte aux cellules du système immunitaire ; en effet, certains TLR sont exprimés par les cellules épithéliales, les kératinocytes ou les fibroblastes (Fichorova et al., 2002; Lebre et al., 2007; Uehara et al., 2007).

b. Les ligands des récepteurs Toll-Like

Les TLR peuvent reconnaître de multiples composés très différents, dérivés des bactéries, des virus mais encore des champignons ou des parasites. Ils peuvent également détecter des composés endogènes tels que des protéines de choc thermique (Figure 9) (Akira et al., 2006).

b.1. Reconnaissance des bactéries

Les TLR reconnaissent principalement des composés dérivés des parois bactériennes ou de l'ADN bactérien. Les bactéries Gram⁺ possèdent une paroi essentiellement constituée de peptidoglycanes (PGN), d'acides lipotéichoïques (LTA) ancrés dans la membrane plasmique et des lipoprotéines di- ou tri-acétylées. TLR2 associé en hétérodimère avec TLR1 reconnaît en particulier des lipoprotéines tri-acétylées, alors que l'hétérodimère TLR2/TLR6 reconnaît le LTA, le PGN et des lipoprotéines di-acétylées (Takeuchi et al., 1999; Yoshimura et al., 1999; Takeuchi et al., 2001; Takeuchi et al., 2002; Nakao et al., 2005). La paroi des bactéries Gram⁻, quant à elle, présente une membrane externe riche en phospholipides, protéines et LPS. Le LPS, spécifique à chaque souche bactérienne, est reconnu par TLR4 (Qureshi et al., 1999; Takeuchi et al., 1999). TLR5 reconnaît la flagelline, protéine entrant dans la composition du flagelle des bactéries mobiles telles que *Salmonella typhimurium* ou *Listeria monocytogenes* (Hayashi et al., 2001; Andersen-Nissen et al., 2007).

L'ADN bactérien contient des motifs CpG non méthylés qui sont quasiment absents des génomes des mammifères. Ces motifs CpG sont reconnus par TLR9 (Hemmi et al., 2000; Uer et al., 2001; Hoene et al., 2006).

b.2. Reconnaissance des virus

Différents composants viraux peuvent être reconnus par les TLR : l'ADN double brin par TLR9, l'ARN simple brin par TLR7 et 8 et l'ARN double brin par TLR3. De même, certaines glycoprotéines d'enveloppe sont reconnues par TLR2 et 4 (Akira et al., 2006), comme celles du rétrovirus MMTV (*Mouse Mammary Tumor Virus*) ou du cytomégalovirus (Compton et al., 2003; Burzyn et al., 2004).

Certains virus tels que le virus à ADN HSV contiennent des génomes riches en CpG non méthylés, comme ceux retrouvés chez les bactéries. Ces virus activent alors la sécrétion de cytokines inflammatoires et d'IFN α par les pDC *via* TLR9 (Lund et al., 2003).

Les premiers ligands décrits pour TLR7 et 8 sont des molécules synthétiques de la famille des imidazoquinolines (R848 et imiquimod) ainsi que des analogues de la guanosine (loxorubine) (Hemmi et al., 2002). Depuis, il a été établi que les ARN simples brins, des virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et de la grippe par exemple, sont les ligands de ces TLR (Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004; Wang et al., 2006). Ainsi, les pDC produisent de l'IFN α en réponse à l'activation par le VIH *via* TLR7 (Beignon et al., 2005).

Au cours de l'infection virale, l'ARN double brin est généré comme intermédiaire de réplication pour les virus à ARN simple brin négatif. Dans ce contexte, les travaux d'Alexopoulou et coll. ont montré pour la première fois l'implication de TLR3 dans la reconnaissance du Poly(IC) (acide polyinosine-deoxycytidilique) ou d'ARN double brin viral (Alexopoulou et al., 2001). TLR3 peut également reconnaître de l'ARNm endogène dérivé de cellules nécrotiques (Kariko et al., 2004). De plus, une très récente étude a établi que l'acide polyinosique (Poly(I)) est un nouveau ligand de TLR3, proposant alors que ce récepteur serait capable de reconnaître des ARN simples brins et doubles brins (Marshall-Clarke et al., 2007).

c. Signalisation induite par les TLR

Après activation par leurs ligands, *via* le recrutement de molécules adaptatrices, les TLR induisent une transduction du signal permettant l'activation des gènes des cytokines pro- ou anti-inflammatoires. Deux voies de signalisation peuvent être activées : une voie MyD88 dépendante ([Figure 10](#)) et une voie MyD88 indépendante ([Figure 11](#)) (Kaisho and Akira, 2006; Albigier et al., 2007; Kawai and Akira, 2007).

c.1. Voie MyD88 dépendante

Tous les TLR excepté TLR3 utilisent MyD88 (Figure 10). MyD88 est recruté et s'associe avec le domaine intracellulaire des TLR puis recrute à son tour les sérines/thréonines kinases IRAK-1 et IRAK-4. Après phosphorylation, ces kinases se dissocient de MyD88 et interagissent avec TRAF6. Dès lors, TRAF6 active TAK1 qui phosphoryle IKK- β et MAPKK6 permettant la dégradation de I- κ B. Cette dégradation de I- κ B permet la libération du facteur de transcription NF- κ B qui est alors transloqué dans le noyau. Parallèlement, TAK1 agit *via* les MAPK kinases MAPKK3 et 6 sur les voies p38 MAPK et JNK, permettant l'activation respective des facteurs de transcription ATF-2 et c-Jun. L'activation de cette voie de signalisation contrôle l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire tels que l'IL-6, l'IL-1 β , le TNF- α et l'IL-12p40.

TLR7 et TLR9 supportent également la synthèse d'IFN de type I et plus particulièrement d'IFN α dans les pDC. Dans ce cas, après stimulation de ces TLR par leur ligand, un complexe comprenant notamment MyD88, IRAK-1 et -4, TRAF6 et IRF-7 est recruté. Au sein de ce complexe, la phosphorylation d'IRF-7, par IRAK-1, entraîne sa dimérisation puis sa translocation nucléaire (Kaisho and Akira, 2006; Albiger et al., 2007; Kawai and Akira, 2007).

c.2. Voie MyD88 indépendante

Cette voie MyD88 indépendante n'est utilisée que par TLR3 et par TLR4 (Figure 11). TRIF, autre adaptateur recruté par TLR3 et TLR4, interagit directement avec TRAF6 et l'activation de la voie NF- κ B se fait *via* TAK1 sans la mise en jeu des protéines IRAK. Par ailleurs, TRIF recrute la protéine kinase RIP1 qui participe également à l'activation de la voie NF- κ B. TRIF active également TBK1 *via* le recrutement de TRAF3 qui phosphoryle alors directement IRF-3 et IRF-7 pour l'activation des gènes inducteurs d'IFN de type I (Kaisho and Akira, 2006; Albiger et al., 2007; Kawai and Akira, 2007).

4. Les récepteurs cytosoliques

Récemment, de nouveaux PRR présents dans le cytoplasme ont été identifiés : la famille des *RIG-Like Receptors* (RLR) et la famille des *NOD Like Receptors* (NLR) (Creagh and O'Neill, 2006; Meylan and Tschopp, 2006; Lee and Kim, 2007). Selon l'entrée du pathogène dans la cellule, par exemple fusion virale *versus* endocytose du virus, différents types de récepteurs

seront impliqués dont certains seront présents à la membrane plasmique, d'autres dans le cytoplasme ou au niveau des endosomes.

a. Les récepteurs RIG-like

La famille des RLR contient actuellement trois membres : RIG-I (*Retinoic acid Inducible Gene*), MDA-5 (*Melanoma Differentiation-Associated Gene*) et Lgp2 (Figure 12). RIG-I et MDA-5 sont impliqués dans la détection directe de virus à ARN ou d'ARN viral néo-synthétisé lors de la réplication virale dans le cytoplasme. Après activation par de tels signaux viraux, ils activent les facteurs NF- κ B et IRF-3 et -7 permettant l'induction d'IFN de type I. Ces deux récepteurs possèdent une structure similaire. Leur domaine hélicase DExD/H permet la reconnaissance des ARN doubles brins, les deux domaines CARD en partie N-terminale sont quant à eux nécessaires à la transduction du signal (Kang et al., 2002; Andrejeva et al., 2004 ; Yoneyama et al., 2004). La troisième hélicase de cette famille Lgp2, dénuée de domaine CARD, agirait comme un régulateur négatif de RIG-I et MDA-5, probablement en séquestrant les ARN doubles brins empêchant ainsi leur reconnaissance par RIG-I et MDA-5 (Rothenfusser et al., 2005; Yoneyama et al., 2005). A la différence des autres PRR, ces récepteurs seraient exprimés de façon ubiquitaire (Creagh and O'Neill, 2006).

RIG-I et MDA-5 sont essentiels pour la reconnaissance de différents groupes de virus à ARN en détectant les ARN doubles brins dans le cytoplasme. RIG-I est le récepteur majoritaire pour divers virus à ARN brin négatif tels que le virus de la maladie de Newcastle, le virus de la stomatite vésiculaire ou encore le virus de la grippe mais de manière surprenante également pour des virus à ARN brin positif comme le virus de l'encéphalite japonaise (Kato et al., 2005; Kato et al., 2006). Néanmoins, il a été récemment démontré que RIG-I détecte également des ARN simples brins présentant un groupe 5'-triphosphate non-cappés (3p-ARN) (Hornung et al., 2006; Pichlmair et al., 2006). Contrairement à RIG-I, MDA-5 est indispensable à la production d'IFN de type I en réponse aux picornavirus comme le virus de l'encéphalomyocardite. Par ailleurs, MDA-5 reconnaît spécifiquement l'ARN double brin synthétique Poly(IC) (Gitlin et al., 2006; Kato et al., 2006). De manière intéressante, les pDC utilisent préférentiellement la voie TLR pour la détection virale contrairement aux mDC qui reconnaissent principalement les virus à ARN *via* RIG-I et MDA-5 (Kato et al., 2005).

b. Les récepteurs NOD-like

La famille des NLR est composée de plus d'une vingtaine de membres caractérisés par la présence d'un domaine LRR en partie C-terminale, d'un domaine central d'oligomérisation et de liaison nucléotidique (NACHT) et d'une partie N-terminale impliquée dans la signalisation cellulaire (domaine CARD pour les récepteurs NOD) (Meylan et al., 2006). Dans cette grande famille sont retrouvés en particulier les récepteurs NOD (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain*) et les récepteurs NALP (*Nacht Domain Leucine-rich repeat and PYD-containing protein*). Nous nous consacrerons dans cette partie qu'aux récepteurs NOD (Figure 13).

NOD1 et NOD2 ont été décrits pour leur capacité à lier différentes structures entrant dans la composition des PGN : NOD1 détecte des muramyl di-peptides (MDP) (Girardin et al., 2003b) tandis que NOD2 détecte des acides méso-diaminopiméliques (méso-DAP) préférentiellement retrouvés chez les bactéries Gram⁻ (Girardin et al., 2003a). Les mécanismes qui permettent à de telles structures d'accéder au cytoplasme sont encore inconnus. NOD1 et NOD2 sont exprimés par de nombreux types cellulaires dont les cellules épithéliales (Uehara et al., 2007), les cellules endothéliales (Opitz et al., 2006) et les DC générées *in vitro* à partir de monocytes (Fritz et al., 2005; Tada et al., 2005).

Le rôle des NOD dans l'immunité anti-bactérienne a été démontré par des études sur des souris *Knock-Out* pour NOD : les souris NOD1^{-/-} présentent une susceptibilité accrue à l'infection par *Helicobacter pylori* (Viala et al., 2004) et les souris NOD2^{-/-} à l'infection par *Listeria monocytogenes* (Kobayashi et al., 2005). Par ailleurs, chez l'homme, il a été établi une corrélation entre un sous-groupe de patients atteints de la maladie de Crohn (inflammation chronique intestinale) et des mutations de NOD2 (gène CARD15) (Hugot et al., 2001; Bianchi et al., 2007). Ces mutations pourraient induire un gain de fonction, c'est-à-dire induiraient une intense activation de NF-κB résultant en une forte production de cytokines inflammatoires (Braat et al., 2005; Maeda et al., 2005). Ainsi, les récepteurs NOD semblent avoir un rôle important dans la mise en place d'une réponse immunitaire anti-bactérienne même si leur rôle précis reste encore à déterminer.

5. Collaboration entre *Pattern Recognition Receptors*

La reconnaissance des signaux de danger par les DC et autres cellules immunitaires intervient grâce aux nombreux PRR exprimés par la cellule. Il est désormais clairement établi que les TLR participent de manière synergique et régulée à la mise en place de la réponse immunitaire (Whitmore et al., 2004; Napolitani et al., 2005; Querec et al., 2006; Sato et al., 2006; Merlo et al., 2007).

Les TLR peuvent également collaborer avec d'autres PRR pour orienter la réponse immune. Les premiers travaux décrivant une collaboration entre TLR et autres récepteurs ont détaillé que la reconnaissance du LPS est médiée par un complexe membranaire comprenant TLR4 et les protéines CD14 et MD-2 (da Silva Correia et al., 2001).

Par ailleurs, Dectin-1 et TLR-2 collaborent pour la reconnaissance et la production de cytokines inflammatoires (TNF- α et IL-12) par les macrophages et les DC (Brown et al., 2003; Gantner et al., 2005). Des interactions entre TLR et récepteurs *scavengers* ont également été décrites ces dernières années. Les travaux de Jeannin et coll. ont établi que la reconnaissance et l'activation cellulaire induite par une protéine de la membrane externe d'une bactérie Gram⁻, nommée KpOmpA, requiert la coopération entre TLR2 et LOX-1 ou SREC-1 (Jeannin et al., 2005). Par ailleurs, CD36 s'associerait avec TLR2/TLR6 pour la reconnaissance du LTA (Triantafilou et al., 2006). Enfin, Gursel et coll. ont récemment établi, dans un modèle *in vitro*, une collaboration indirecte de SR-PSOX/CXCL16 avec TLR9 dans laquelle SR-PSOX/CXCL16 favoriserait l'endocytose d'oligonucléotides de type D permettant alors l'induction de la production d'IFN α par TLR9 (Gursel et al., 2006). Les récepteurs cytosoliques RLR et NLR semblent également impliqués dans des mécanismes de collaboration avec des TLR. NOD2, en particulier, interagit avec TLR4 et TLR2 pour la reconnaissance de *Mycobacterium paratuberculosis*, bactérie qui pourrait être impliquée dans la maladie de Crohn (Ferwerda et al., 2007).

De manière surprenante, l'interaction TLR-lectine peut également induire une diminution de la réponse immunitaire pro-inflammatoire. En effet, la liaison du lipoarabinomannane de *Mycobacterium tuberculosis* (ManLAM) à DC-SIGN bloquerait la maturation des DC induite par le LPS *via* TLR4 et augmenterait simultanément la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Geijtenbeek et al., 2003). La liaison de ManLAM à DC-SIGN active la sérine/thréonine kinase Raf-1 permettant l'acétylation de l'unité p65 de

NF- κ B qui induit alors la synthèse d'IL-10. Cette acétylation de p65 n'est possible qu'après activation de NF- κ B par les TLR (Gringhuis et al., 2007). Ainsi, ces travaux démontrent que les PRR peuvent moduler la réponse immunitaire induite par les TLR en réponse à un pathogène.

Les cellules de l'immunité innée, et en particulier les DC, expriment donc de nombreux PRR leur permettant de reconnaître une pléthore de pathogènes et signaux de danger. Ces récepteurs agissent suivant le mécanisme d'entrée du virus dans la cellule hôte (fusion ou endocytose), les DC organisant une réponse immune adaptée intégrant les signaux des divers PRR engagés.

C. Autres fonctions des cellules dendritiques

1. Apprêtement et présentation de l'antigène aux lymphocytes T

La reconnaissance des antigènes protéiques par les lymphocytes T nécessite leur apprêtement par les DC, c'est-à-dire leur dégradation en peptides par des enzymes protéolytiques puis leur présentation par les molécules du CMH. De manière générale, les peptides dérivés d'antigènes exogènes sont présentés aux lymphocytes T CD4⁺ par les molécules du CMH de classe II tandis que les peptides dérivés d'antigènes endogènes sont présentés aux lymphocytes T CD8⁺ par les molécules du CMH de classe I (Figure 14). Cependant, cette dichotomie n'est pas si stricte comme l'atteste l'existence des phénomènes de présentation croisée, présentation d'antigènes exogènes par le CMH de classe I, et de présentation d'antigènes endogènes par le CMH de classe II (Dani et al., 2004).

a. Apprêtement d'antigènes exogènes par le CMH de classe II

Les antigènes capturés par les DC sont dirigés vers les endosomes tardifs et des compartiments de type lysosomal riches en CMH de classe II, les compartiments MIIC, où ils sont partiellement dégradés en peptides. La chaîne invariante Ii/CD74 bloque le site de liaison aux peptides lors du transport des molécules de CMH-II aux compartiments MIIC. Dans ces compartiments acides, la chaîne invariante est alors dégradée et remplacée par un peptide CLIP (*Class II-associated Ii peptide*), lui-même remplacé ensuite par un peptide antigénique (Villadangos et al., 2005). Les complexes CMH-II/peptide antigénique ainsi

formés sont exportés vers la membrane plasmique soit en passant par un compartiment de transit dénommé CIIV (vésicules de classe II) (Pierre and Mellman, 1998), soit par fusion directe du compartiment MIIC avec la membrane plasmique, permettant ainsi l'expression des complexes CMH-II/peptide à la membrane plasmique (Zitvogel et al., 1998).

b. Apprêtement d'antigènes endogènes par le CMH de classe I

L'expression des molécules du CMH de classe I est ubiquitaire contrairement à celles du CMH de classe II restreinte aux APC. Ces molécules sont associées à des peptides issus de la dégradation cytosolique d'antigènes endogènes ou d'antigènes provenant d'agents infectieux par le protéasome. D'où proviennent ces peptides antigéniques ? La majorité des peptides proviennent de protéines du cytoplasme et de nombreuses protéines non fonctionnelles générées lors de la synthèse protéique, appelées DRIPs (*Defective Ribosomal Product*). D'autres peptides peuvent également provenir de protéines rétro-transloquées du réticulum endoplasmique vers le cytoplasme. Les peptides endogènes sont ubiquitinés puis dégradés par le protéasome (Yewdell et al., 2001; Mellman, 2005). Les peptides obtenus sont alors transportés dans le réticulum endoplasmique *via* des transporteurs dénommés TAP (*Transporter-Associated with antigen Processing*) et, si nécessaire, sont réduits par l'aminopeptidase ERAP en peptides de huit à dix acides aminés, taille généralement requise pour l'association avec les molécules de CMH-I (York et al., 2002). Le chargement de ces peptides a lieu dans le réticulum endoplasmique puis les complexes CMH-I/peptide ainsi formés transitent *via* l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique (Cresswell et al., 2005).

c. Présentation croisée d'antigènes exogènes par le CMH de classe I

L'origine de la découverte de ce processus remonte à M. Bevan qui, en 1976, a démontré que l'activation de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) *in vivo* se produisait après présentation d'antigènes exogènes par les molécules du CMH de classe I (Bevan, 1976). Un tel processus est appelé **présentation croisée** ou « **cross présentation** ».

De nombreux antigènes peuvent être présentés par cette voie. En effet, la phagocytose de bactéries (Rescigno et al., 1998; Datta et al., 2006) ainsi que celle de corps apoptotiques de cellules infectées ou de tumeurs permet une présentation croisée efficace (Blachere et al., 2005; Bosnjak et al., 2005; Nouri-Shirazi et al., 2000). Par ailleurs, la présentation croisée peut se faire *via* des antigènes associés à des protéines de choc thermique (Delneste et al., 2002; Kurotaki et al., 2007) ou suite à l'endocytose de complexes immuns par les récepteurs des

fragments Fc des Ig (Regnault et al., 1999; Matsuo et al., 2004). Les DC peuvent également « cross-présenter » des antigènes viraux dérivés de cellules infectées vivantes ou apoptotiques ou intégrés dans des lipopeptides (Larsson et al., 2001; Andrieu et al., 2003; Maranon et al., 2004).

Plusieurs hypothèses ont été envisagées pour expliquer la présentation croisée (Cresswell et al., 2005; Groothuis and Neefjes, 2005; Shen and Rock, 2006):

(i) voie vacuolaire : les molécules du CMH-I chargeraient des peptides générés dans des phagosomes par un mécanisme TAP-indépendant encore inconnu,

(ii) voie phagosome-cytoplasme : les antigènes seraient libérés dans le cytoplasme puis dégradés dans le protéasome où ils seraient alors transportés par les TAP au niveau du réticulum endoplasmique et chargés sur les molécules du CMH de classe I,

(iii) voie phagosome-cytoplasme-phagosome : le réticulum endoplasmique fusionnerait avec le phagosome, permettant l'acquisition, en particulier des molécules du CMH-I et des TAP ; les antigènes seraient alors libérés dans le cytoplasme pour être dégradés par le protéasome puis seraient re-importés dans le phagosome où ils seraient chargés sur les molécules du CMH-I,

(iv) voie des jonctions communicantes « *Gap junctions* » : des peptides cytosoliques pourraient provenir directement d'échanges entre cellules *via* leurs jonctions communicantes,

(v) voie endosome-réticulum endoplasmique : les antigènes seraient transportés directement des endosomes au réticulum endoplasmique où ils seraient dégradés par le système ERAD et accèderaient ainsi à la voie classique de présentation par les molécules du CMH-I.

Par ce mécanisme de présentation croisée, les DC participent à la mise en place de réponses adaptatives T CD8⁺ anti-virales et anti-tumorales.

2. Induction et orientation de la réponse immunitaire

a. Polarisation de la réponse T CD4⁺

Les DC possèdent la capacité à activer des lymphocytes T naïfs CD4⁺ effecteurs. Cette activation nécessite trois signaux immunologiques différents. Le premier signal passe par la reconnaissance du complexe CMH/antigène par le complexe TCR/CD4 des lymphocytes, le

second signal met en jeu les molécules d'adhésion et de co-stimulation. Enfin le troisième signal regroupe les éléments, tels que les cytokines sécrétées par les DC, permettant la polarisation en un type spécifique de lymphocyte T *helper* ou auxiliaires (Th).

a.1. Th1 versus Th2

Dans les années 1980, T. Mosmann et R. Coffman ont introduit la notion de réponses Th1 *versus* Th2 suite à l'observation chez la souris de sous-populations lymphocytaires ne sécrétant pas les mêmes cytokines (Mosmann et al., 1986). Cette classification a ensuite été appliquée chez l'homme (Romagnani, 1991). Le profil de cytokines synthétisées par les lymphocytes **Th1** est dominé par l'IFN γ , l'IL-2 et le TNF- α . Au contraire les lymphocytes **Th2** sécrètent principalement de l'IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-13 (Figure 15). La production de cytokines par les lymphocytes d'un type inhibe le développement de l'autre population. Une vision relativement simpliste de la dichotomie Th1/Th2 indique que les lymphocytes Th1, LT auxiliaires de LT CD8⁺, sont impliqués dans les réponses cytotoxiques, tandis que les lymphocytes Th2, LT auxiliaires des lymphocytes B, initient des réponses humorales (Kidd, 2003).

La différenciation des lymphocytes en types Th1 ou Th2 est dépendante de la production de cytokines par les DC. De manière générale, la sécrétion d'IL-12 oriente dans la voie Th1, alors que les DC ne produisant pas d'IL-12 orientent plutôt dans la voie Th2. Ainsi, la nature du stimulus reconnu par les DC, en modulant la production de cytokines, influence fortement la polarisation T. L'équipe de B. Pulendran a démontré que des MoDC activées par des ligands de TLR4 ou TLR5 (LPS ou flagelline) induisent une polarisation de type Th1 tandis que l'activation par un ligand de TLR2 (Pam₃C) ou par les œufs de *Schistosoma mansoni* induit une polarisation de type Th2 (Agrawal et al., 2003). Par ailleurs, il a été également établi que le vaccin de la fièvre jaune (virus atténué), activant les DC *via* différents TLR, induit une double polarisation Th1 et Th2 (Querec et al., 2006). De nombreuses autres études confirment que la polarisation Th1/Th2 est influencée par le type de micro-organisme reconnu par les DC *via* les PRR qu'elles expriment (Kapsenberg, 2003; Pulendran, 2005). Par ailleurs, bien que la nature du stimulus microbien soit important pour la polarisation de la réponse, la réponse immunitaire est fortement influencée par l'environnement des DC. En effet, en plus d'être activées *via* des PRR, les DC intègrent des signaux générés par les cellules épithéliales, stromales ou endothéliales du tissu où elles résident (Sato and

Iwasaki, 2004; Nolte et al., 2007). Par exemple, la cytokine TSLP (*Thymic Stromal Lymphopoietin*), cytokine de la famille de l'IL-7 produite par les cellules épithéliales, oriente la réponse immunitaire vers une réponse allergique de type Th2 (Soumelis et al., 2002; Rimoldi et al., 2005). En conséquence, la capacité des DC à polariser la réponse immunitaire adaptative est liée à la nature des antigènes détectés ainsi qu'aux facteurs environnementaux (Nolte et al., 2007).

a.2. Th17

En 2005, Langrish et coll. ont découvert, dans un modèle murin d'EAE (*Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*), une nouvelle classe de lymphocytes *helper*, les **Th17**, caractérisés par la production d'IL-17 (Langrish et al., 2005). Ces cellules se développent en présence de TGF- β et d'IL-6 et nécessitent la présence d'IL-23 pour leur expansion (Figure 15) (Dong, 2006; Mangan et al., 2006). Chez l'homme, une récente étude a caractérisé les Th17 isolés de l'intestin de patients atteints de la maladie de Crohn : ces lymphocytes Th17 expriment le récepteur de l'IL-23, CCR6, et le facteur de transcription ROR γ t (Annunziato et al., 2007). Ces cellules Th17 sont impliquées dans des maladies auto-immunes telles que l'arthrite induite par le collagène (CIA, *Collagen Induced Arthritis*) et l'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE) (Harrington et al., 2005; Langrish et al., 2005; Park et al., 2005). Elles sont également impliquées dans les infections bactériennes comme les infections à *Bordetella pertussis* (Higgins et al., 2006) ou les infections fongiques à *Candida albicans* (Leibundgut-Landmann et al., 2007). Chez l'homme, contrairement à la souris, il a été décrit l'existence de lymphocytes Th17 produisant de l'IFN γ , dénommés alors Th17/Th1 (Annunziato et al., 2007). Le rôle de cette population partageant des caractéristiques communes aux cellules Th1 et aux cellules Th17 est encore inconnu.

b. Activation des lymphocytes T CD8⁺

Outre leur rôle dans la polarisation des LT CD4⁺, les DC présentent également la capacité d'activer les lymphocytes T CD8⁺ *via* la présentation d'antigènes sur leurs molécules du CMH-I. Dans l'infection par le VIH, par exemple, l'activation des lymphocytes T CD8⁺ est particulièrement importante puisqu'elle permet de contrôler la réplication virale. En effet, ces CTL lysent les cellules infectées et produisent de l'IFN γ , présentant une très forte activité anti-virale. Marañón et coll. ont ainsi démontré *in vitro* que les MoDC sont capables de « *cross-présenter* » des antigènes viraux dérivés de cellules infectées vivantes ou

apoptotiques et ainsi d'activer des réponses CTL spécifiques anti-VIH (Maranon et al., 2004; Yan et al., 2004). Au contraire, la capacité des pDC à faire de la présentation croisée est encore discutée, certaines études démontrant que les pDC ne sont pas efficaces pour « *cross-présenter* » des antigènes tumoraux contrairement aux mDC tandis que d'autres ont établi leur capacité à présenter des antigènes à des LT CD8⁺ (Schnurr et al., 2005 ; Marañón C. communication personnelle, Congrès Annuel CFCD 2006).

c. Interaction avec les cellules NK

Les DC peuvent influencer les fonctions des cellules NK, acteurs du système immunitaire inné. En effet, le rôle des mDC dans l'activation des NK a été démontré chez l'homme et chez la souris *in vitro* (Fernandez et al., 1999; Ferlazzo et al., 2004; Andoniou et al., 2005; Baratin et al., 2005). Deux récents travaux *in vivo* ont confirmé l'importance des interactions entre DC et NK dans l'induction de réponses anti-virales et anti-bactériennes, en utilisant des souris transgéniques délétées des DC CD11c⁺. Grâce à ce modèle, Kassim et coll. établissent qu'en absence de mDC, la susceptibilité au virus de l'herpès est fortement augmentée, due à une altération de l'activation des cellules NK et des LT (Kassim et al., 2006). De plus, Lucas et coll. démontrent que les cellules NK n'acquièrent pas leur fonction effectrice sans interaction avec des DC CD11c⁺ au sein des ganglions lymphatiques (Lucas et al., 2007).

Inversement, les cellules NK peuvent interagir sur les DC. Les cellules NK peuvent diriger la maturation des DC par la production en particulier de TNF- α et d'IFN γ (Vitale et al., 2005). Elles peuvent également induire la lyse de certaines DC immatures *via* TRAIL, (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) (Hayakawa et al., 2004). Cette lyse permet de supprimer les DC n'ayant pas correctement mûri, c'est ce que l'on appelle « *DC editing* » (Moretta et al., 2006).

d. Interaction avec les lymphocytes T régulateurs

En plus de leur rôle dans l'initiation de la réponse immunitaire, les DC sont également impliquées dans la mise en place de la tolérance. Selon leur stade de maturation, les signaux environnementaux ou leur origine, différentes populations de DC, alors dénommées DC tolérogènes, induisent l'activation des LT régulateurs CD4⁺ CD25⁺, caractérisés par leur capacité à supprimer la prolifération des LT effecteurs (Hubert et al., 2007; Morelli and Thomson, 2007).

3. Cas particulier des cellules de Langerhans et des cellules dendritiques dermiques

a. Capture antigénique et activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques cutanées

En accord avec leur appartenance aux DC, les CL et les DDC, DC immatures, peuvent capturer des antigènes, les apprêter puis les présenter sur leurs molécules du CMH.

Les CL et les DDC humaines, fraîchement isolées de peau humaine sont capables de capturer efficacement divers composés tels que l'ovalbumine ou la toxine tétanique (Nestle et al., 1998; Pure et al., 1990). Nestlé et coll. démontrent que le mécanisme d'internalisation de la toxine tétanique diffère entre les deux types cellulaires : les DDC l'internalisent par endocytose dépendante de la clathrine alors que les CL utilisent la macropinocytose (Nestle et al., 1998). Par ailleurs, les CL peuvent internaliser des billes de latex (Figure 16) (Reis e Sousa et al., 1993). Par contre, elles n'interviennent pas dans l'internalisation de *Borrelia burgdorferi*, bactérie responsable de la maladie de Lyme, contrairement aux DDC qui la phagocytent efficacement puis sont capables de stimuler la prolifération de LT naïfs et spécifiques (Filgueira et al., 1996). Enfin, grâce à leur expression de lectines de type C, les cellules dendritiques cutanées interviennent, entre autres, dans la liaison et l'endocytose du VIH (Turville et al., 2002; de Witte et al., 2007; Hladik et al., 2007).

Les DC du derme présentent une activité stimulatrice de lymphocytes T naïfs autologues et allogéniques aussi importante que celle des CL (Nestle et al., 1998; Morelli et al., 2005). Cette activité est majoritairement réalisée par la sous-population dermique CD1c⁺ (Meunier et al., 1993; Sepulveda-Merrill et al., 1994). Les DDC ne possèdent pas la capacité à présenter des antigènes lipidiques aux LT contrairement aux CL, pourvues d'une intense expression de CD1a et de langerin (Pena-Cruz et al., 2003; Hunger et al., 2004). Enfin, actuellement, aucun travail ne détaille la capacité des DDC isolées de peau humaine à « cross-présenter » des antigènes. Cependant, des études *in vitro*, y compris la très récente étude de Cao et coll., ont établi que les DDC, générées à partir de précurseurs hématopoïétiques ou de monocytes, « cross-présentent » des antigènes tumoraux (Nouri-Shirazi et al., 2000; Cao et al., 2007). Les études concernant les CL générées *in vitro* démontrent qu'elles réalisent la présentation croisée d'antigènes viraux ou de complexes immuns aux LT CD8⁺ (Matsuo et al., 2004; Yan et al., 2004).

b. Rôle des cellules de Langerhans et les cellules dendritiques dermiques dans l'immunité cutanée

Les CL jouent un rôle essentiel dans l'initiation et le contrôle de l'immunité cutanée (se référer aux revues (Schuler and Steinman, 1985; Romani et al., 2003)). Cependant au cours de ces dernières années, diverses études ont suggéré que les fonctions précédemment attribuées au CL seraient en fait effectuées par d'autres DC, telles que les DDC ou certaines populations de DC des ganglions lymphatiques. Ces travaux, essentiellement réalisés chez la souris, abordent le rôle des CL et des DDC dans l'immunité cutanée, en particulier dans les réactions d'hypersensibilité de contact, mais également dans les réponses anti-virales et anti-parasitaires.

Afin d'étudier *in vivo* le rôle des CL, une très élégante technique de déplétion inductible des CL a été mise au point ces dernières années : les **souris Langerin-DTR**. Dans ces souris Langerin-DTR, le gène codant pour le récepteur de la toxine diphtérique (DTR) a été inséré dans une région non codante du gène de la langerin. Ainsi, l'activation du DTR par son ligand la toxine diphtérique (DT) induit l'apoptose des cellules langerin positive, et donc la déplétion des souris en CL (Bennett et al., 2005; Kissenpfennig et al., 2005). Cette méthode évite l'induction d'une inflammation cutanée généralement observée suite à l'utilisation des techniques de « *tape-stripping* » (d'arrachage épidermique) ou des UV, techniques anciennement utilisées pour dépléter les CL de l'épiderme. Bennett et coll. démontrent ainsi que la réaction d'hypersensibilité de contact (CHS) est amoindrie en absence de CL mais pas complètement inhibée, attestant du rôle à la fois des CL et des DDC dans cette pathologie (Bennett et al., 2005). Kissenpfennig et coll., quant à eux, démontrent que les CL ne sont pas nécessaires à l'induction d'une CHS (Kissenpfennig et al., 2005). Par ailleurs, leurs travaux démontrent que les DDC migrent plus rapidement hors de la peau et qu'elles colonisent une zone distincte des ganglions lymphatiques de celle colonisée par les CL, suggérant alors que les CL et les DDC interagiraient avec des populations de LT distinctes (Kissenpfennig et al., 2005). Au contraire et de manière très surprenante, les travaux de Kaplan et coll. utilisant un modèle de déplétion de CL similaire mais non inductible, montrent que la déplétion de CL augmente la CHS, indiquant que les CL réguleraient la réponse immunitaire induite par des allergènes de contact (Kaplan et al., 2005).

Le rôle des CL dans l'immunité anti-virale a été également reconsidéré suite aux résultats des équipes de F. Carbone et A. Iwasaki. En effet, après infection de la peau par HSV-1, Allan et coll. démontrent que les CL ne sont pas responsables de la présentation d'antigènes viraux aux LT cytotoxiques CD8⁺, présentation qui serait réalisée par une autre population de DC CD8⁺ retrouvée dans les ganglions lymphatiques (Allan et al., 2003). De même, Zhao et coll. démontrent l'implication des DC du chorion, recrutées lors de l'infection du vagin par HSV-2, dans la présentation aux LT CD4⁺ et l'orientation d'une réponse Th1 (Zhao et al., 2003). Néanmoins, ces études n'excluent pas que les CL aient pu capturer des antigènes et migrer hors du compartiment épithélial mais indiquent que ce ne sont pas elles qui activent les LT et induisent la réponse immunitaire. En effet, récemment, Allan et coll. ont établi que la présentation croisée d'antigènes HSV-1 aux LT CD8⁺ est effectuée par les DC CD8⁺ des ganglions lymphatiques. Cependant, cette activation nécessite la migration des CL et des DDC de la peau, qui joueraient alors simplement un rôle de transporteur de l'antigène (Allan et al., 2006). Ces résultats soulèvent de nombreuses questions, et en particulier la généralisation de ce phénomène à d'autres types d'infections et à d'autres tissus ; en effet He et coll. démontrent qu'au contraire, dans un modèle d'infection par un lentivirus, les DC de la peau sont capables d'activer les LT CD8⁺ (He et al., 2006).

D'autres travaux chez la souris infectée par le parasite *Leishmania* démontrent également que les CL ne sont pas impliquées *in vivo* dans l'initiation de réponses T spécifiques (Ritter et al., 2004). En effet, il semble que ce soit, comme pour les infections par HSV, une sous-population de DC des ganglions lymphatiques qui soit responsable de l'activation des LT CD4⁺ *in vivo* (Iezzi et al., 2006). Comment sont alors transportés ces antigènes ? Les CL et les DDC pourraient transporter les antigènes jusque dans les ganglions lymphatiques comme proposé par Allan et coll. (Allan et al., 2006), les antigènes pourraient également être véhiculés par d'autres types cellulaires comme les neutrophiles (Abadie et al., 2005), enfin des antigènes solubles pourraient atteindre seuls les ganglions lymphatiques comme observé lors d'infection par *Leishmania* (Misslitz et al., 2004).

c. Implications d'autres cellules dendritiques dans les maladies cutanées inflammatoires

Dans certaines conditions pathologiques et/ou inflammatoires, d'autres populations de DC non résidentes dans la peau peuvent être recrutées dans la peau comme les cellules

dendritiques plasmacytoïdes (pDC) ou les cellules dendritiques épidermiques inflammatoires (IDEC). Ces cellules pourraient diriger la mise en place de la réponse immunitaire à la place des DC cutanées résidentes.

Les IDEC ont été identifiées dans des lésions de psoriasis, d'eczéma atopique et de dermatite de contact, mais sont absentes dans le lupus érythémateux (Wollenberg et al., 1996; Wollenberg et al., 1999; Wollenberg et al., 2002a). Cette population se distingue des CL par leur phénotype, par l'absence de BG et d'expression de Lag et par une faible expression de CD1a. Par ailleurs, elles expriment spécifiquement FcεRI, FcεRII, CD11b et MMR (Wollenberg et al., 1996; Wollenberg et al., 1999; Wollenberg et al., 2002a). Dans la dermatite atopique, les IDEC, recrutées par les CL résidentes grâce à la sécrétion de cytokines inflammatoires, amplifient la réponse inflammatoire pré-induite par les CL et, par le relargage d'IL-12 et IL-18, réorientent vers une réponse de type Th1 (Novak et al., 2004).

Les pDC, absentes dans la peau normale, ont été mises en évidence dans des lésions de psoriasis, de dermatite de contact et de lupus érythémateux, au niveau de la couche basale de l'épiderme et du derme papillaire (Farkas et al., 2001; Wollenberg et al., 2002b; Bangert et al., 2003; Gilliet et al., 2004; Vermi et al., 2005). Contrairement aux IDEC, les pDC ne sont pas retrouvées pas dans les lésions de dermatite atopique (Wollenberg et al., 2002b). Chez les patients atteints de psoriasis, elles s'accumulent dans la peau, s'activent et produisent de l'IFNα durant les phases de développement de la maladie. Cette production d'IFNα conduit à l'évolution du psoriasis *via* l'activation et l'expansion de lymphocytes T auto-immuns (Nestle et al., 2005).

Les CL et les DDC sont des CPA professionnelles. Leur capacité à capturer, apprêter des antigènes puis les présenter à des LT a été clairement démontrée et confirmée. Les nouvelles technologies mises au point ces dernières années (Souris Langerin-DTR par exemple) ont permis d'évaluer plus précisément le rôle de ces DC de la peau dans certaines pathologies/infections *in vivo*. Cependant le rôle clair et précis des CL et des DDC dans l'induction de réponses T CD4⁺ et CD8⁺ dans la peau reste encore mal connu.

Les DDC et les CL sont présentes dans d'autres tissus périphériques tels que les muqueuses génitales. Quel rôle jouent ces DC et plus particulièrement les CL, dans l'immunité de la muqueuse, spécialement lors de l'infection par le VIH ?

2. ROLE DES CELLULES DENDRITIQUES DES MUQUEUSES DANS LA TRANSMISSION DU VIH PAR VOIE SEXUELLE

A. Le virus de l'immunodéficience humaine

Le **virus de l'immunodéficience humaine 1 (VIH-1)** a été isolé et identifié en 1983 par l'Équipe du Professeur Luc Montagnier à l'Institut Pasteur, à partir de prélèvements de ganglions de patients atteints de lymphadénopathie (Barre-Sinoussi et al., 1983). Il est responsable du **Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquise (SIDA)** se traduisant par une perte de lymphocytes T (LT) CD4⁺, entraînant ainsi un grave dysfonctionnement du système de défense de l'organisme. Avec près d'un mort toutes les dix secondes à travers le monde, le SIDA reste aujourd'hui un problème majeur de santé publique.

1. Epidémiologie

Un quart de siècle après l'apparition du SIDA, environ 38,6 millions de personnes vivaient avec le VIH à la fin de l'année 2005, dont environ 95% dans les pays en voie de développement (Figure 17). L'ONUSIDA estime que 4,1 millions d'individus ont contracté une infection et que quelques 2,8 millions sont décédés à cause du SIDA en 2005. Néanmoins, malgré les programmes de prévention et les changements de comportements, le nombre de personnes vivant avec le SIDA continue d'augmenter, en raison de la croissance de la population et des bénéfices des thérapies anti-rétrovirales prolongeant la durée de vie (www.unaids.org).

2. Structure de la particule virale

Le VIH est un rétrovirus de la famille des lentivirus. Il existe deux types de VIH (VIH-1 et VIH-2), se différenciant par leur origine géographique et leur organisation génomique. Contrairement au VIH-1, le VIH-2 se localise principalement en Afrique de l'Ouest et il est peu répandu. Le VIH-1 est divisé en trois sous-groupes : M (Majeur, responsable de la pandémie), O (Outlier) et N (ni M ni O). Le groupe M est le plus répandu dans le monde et se sous-divise en onze sous-types ou clades (A à K), dont les sous-types A, B, C, D et E sont majoritaires.

Chaque particule virale, ou virion, présente une structure sphérique d'environ 110 nm de diamètre (Figure 18). Elle possède une enveloppe lipidique (Env) dans laquelle s'insèrent les glycoprotéines de surface gp120 et les glycoprotéines transmembranaires gp41. Elle contient les protéines de matrice (p17), essentielles au maintien de leur intégrité et à l'incorporation des protéines d'enveloppe dans les virions matures. Enfin, au centre de la particule virale se trouve la capsid (p24) de forme trapézoïdale. Elle entoure le génome viral constitué par deux copies d'ARN monocaténaire en orientation positive, associées aux protéines de la nucléocapsid (p6 et p7/p9), à la transcriptase inverse (RT, *Reverse Transcriptase*) hétérodimérique (p66 et p51) ainsi que d'autres enzymes virales (intégrase p32 et protéase virale p10).

3. Organisation génétique

Chaque molécule d'ARN viral est bordée par deux régions LTR (*Long Terminal Repeat*). Le LTR en position 5' joue un rôle de promoteur fort tandis que le LTR en position 3' est indispensable pour achever la transcription des gènes viraux. Le génome viral est composé de neuf gènes (Figure 19).

Trois gènes majeurs qui sont :

- ***gag*** (*group-specific antigen*) code pour l'expression des protéines structurales du virion c'est-à-dire les protéines de la matrice p17, de la capsid p24 et de la nucléocapsid p7/p9

- ***pol*** (polymérase) code pour l'expression des enzymes impliquées dans la réplication, l'intégration virale et la maturation du virion c'est-à-dire la protéase p10, la transcriptase inverse p66/p51 et l'intégrase p32

- ***env*** (enveloppe) code pour l'expression de la glycoprotéine d'enveloppe gp160 qui est clivée lors de la maturation de la particule virale en gp120 et gp41

A part ces trois gènes majeurs, le génome du VIH-1 code également pour l'expression de deux protéines régulatrices, le transactivateur de la transcription (Tat) et le régulateur de l'expression des gènes du virion (Rev). Ces deux protéines sont indispensables à la réplication virale. Enfin, quatre gènes codent pour l'expression de protéines dites accessoires car non essentielles à la réplication virale : Nef, Vif, Vpr et Vpu.

4. Cycle de réplication virale

Le cycle de réplication du VIH est divisé en une phase précoce, où le génome viral s'intègre dans celui de la cellule hôte, et une phase tardive aboutissant à la formation de nouveaux virions. Le cycle de réplication comprend quatre grandes étapes (Figure 20) :

- (a) la fixation du virus et son entrée dans la cellule cible
- (b) la transcription inverse de son ARN simple brin en molécule d'ADN double brin et l'intégration de l'ADN proviral dans le génome de la cellule hôte
- (c) l'expression des gènes viraux et l'assemblage du virus
- (d) le bourgeonnement du virion et sa maturation

a. Reconnaissance et entrée virale

Le VIH-1 s'attache à la surface de la cellule hôte par l'interaction de haute affinité entre la glycoprotéine virale d'enveloppe gp120 et le récepteur CD4. Cette liaison est renforcée par l'interaction avec les co-récepteurs CCR5 et CXCR4. Ces liaisons de la gp120 avec des molécules de l'hôte induisent un changement conformationnel de la gp120. La région variable V3 de la gp120 est alors exposée, lui donnant accès au co-récepteur viral. Cela permet également le démasquage de la protéine gp41 exposant alors un peptide de fusion, assurant la fusion des membranes virale et cellulaire (Zaitseva et al., 2003). La capside virale est alors libérée dans le cytoplasme (Figure 21).

a.1. Le récepteur CD4

La découverte du VIH-1 a été rapidement suivie par la caractérisation de son récepteur, la molécule CD4 (Sattentau et al., 1988; Sattentau and Weiss, 1988). Cette protéine appartient à la superfamille des immunoglobulines. Elle s'exprime fortement sur les LT CD4⁺ matures, et plus faiblement sur les monocytes, macrophages et cellules dendritiques.

a.2. Les co-récepteurs CXCR4 et CCR5

Le VIH utilise deux récepteurs aux chimiokines comme co-récepteurs majeurs. CXCR4, préalablement dénommé fusin, a été le premier co-récepteur décrit (Feng et al., 1996), suivi de près par la description de CCR5 (Alkhatib et al., 1996; Deng et al., 1996; Dragic et al., 1996). De manière très intéressante, l'interaction de CXCR4 avec son ligand naturel SDF-1 α (*Stromal cell-Derived Factor 1*) induit l'internalisation de CXCR4 permettant une inhibition de l'entrée virale (Agace et al., 2000; Oberlin et al., 1996; Amara et al., 1997). De même, les

chimiokines RANTES, MIP-1 α et MIP-1 β , ligands de CCR5, inhibent l'entrée du VIH (Cocchi et al., 1995).

L'utilisation de l'un ou l'autre des co-récepteurs qualifie le tropisme viral. Les virus de type X4, c'est-à-dire à tropisme T ou SI (Inducteur de Syncitium), qui ont la propriété de se répliquer dans les LT et de former des syncytia, utilisent le récepteur CXCR4. Quant aux virus R5, à tropisme M ou NSI (Non Inducteur de Syncitium), ils infectent majoritairement les macrophages et utilisent le récepteur CCR5. Il existe également des virus dits *multi-tropic* car capables d'utiliser les deux co-récepteurs (Berger et al., 1998).

D'autres récepteurs aux chimiokines ont également été identifiés comme co-récepteurs au VIH principalement dans des modèles de cellules transfectées (pour revue (Berger et al., 1999)). Parmi ces récepteurs sont retrouvés CCR2b (Doranz et al., 1996), CCR3 (Choe et al., 1996 ; Doranz et al., 1996), CCR8 (Rucker et al., 1997; Horuk et al., 1998), CCR9 (Choe et al., 1998), CX3CR1 (Rucker et al., 1997; Combadiere et al., 1998) et CXCR6/Bonzo/STRL33 (Deng et al., 1997; Liao et al., 1997; Pohlmann et al., 1999) mais également ChemR23, récepteur de la Chemerin (Samson et al., 1998; Martensson et al., 2006), GPR15/BOB (Farzan et al., 1997; Deng et al., 1997; Edinger et al., 1998a) ou encore APJ (Edinger et al., 1998b). Contrairement à CCR5 et CXCR4, aucun rôle *in vivo* de ces récepteurs n'a pu être démontré, de plus leur efficacité dans l'entrée virale est moindre (Zaitseva et al., 2003). Ces récepteurs sont donc considérés comme co-récepteurs alternatifs et CCR5 et CXCR4 comme les co-récepteurs majeurs au VIH.

a.3. Autres récepteurs cellulaires

Il est maintenant reconnu que dans les cellules déficientes en CD4 et/ou co-récepteurs viraux, l'enveloppe virale se lie à d'autres molécules exprimées à la surface cellulaire.

⌘ Les lectines de type C

Les lectines de type C telles que DC-SIGN ou la langerin, exprimées par les DC, sont impliquées dans la liaison du VIH. Ce chapitre sera développé ultérieurement dans la partie C « Interaction des cellules dendritiques avec le VIH ».

⌘ Les glycosphingolipides

Les glycosphingolipides sont formés d'un céramide auquel est lié une grande variété de glucides. Le Galactosylcéramide (GalCer), un cérébroside, lie les glycoprotéines d'enveloppe gp120 (Bhat et al., 1991; Harouse et al., 1991; Bomsel, 1997) et gp41 (Alfsen and Bomsel, 2002) et permettrait la transmission du VIH à travers l'épithélium intestinal (Fantini et al., 1993).

⌘ Les protéoglycanes (pour revue (Gallay, 2004))

Les protéoglycanes sont présents dans tous les tissus conjonctifs et matrices extracellulaires. Ils sont également exprimés à la surface de nombreuses cellules. Plusieurs études démontrent l'implication des héparane sulfates dans la liaison du VIH à la cellule hôte (Patel et al., 1993; Mondor et al., 1998). Le VIH utilise les syndecans, protéoglycanes transmembranaires, pour se lier aux macrophages exprimant peu CD4 (Saphire et al., 2001). Les syndecans semblent également être impliqués dans la transmission du virus à travers la muqueuse génitale féminine et le placenta (Bobardt et al., 2007; Vidricaire et al., 2007).

⌘ Les récepteurs du complément

Plusieurs études montrent que l'opsonisation du VIH par le complément augmente l'infection de cellules immunitaires en culture (Delibrias et al., 1994; Bouhlal et al., 2002; Bajtay et al., 2004).

b. Transcription inverse et intégration

Après fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique, le contenu de la particule virale est libéré dans le cytoplasme. Le génome viral et les constituants viraux s'organisent pour former un complexe nucléoprotéique de pré intégration. Ce complexe contient la RT virale, l'intégrase, les protéines de la nucléocapside, de la matrice gag et Vpr. L'ARN viral génomique monocaténaire est rétrotranscrit en ADN complémentaire double brin linéaire par la RT. L'ADN viral néo-formé est transporté vers le noyau où il est intégré dans le génome de la cellule de façon aléatoire sous l'action de l'intégrase.

c. Transcription du génome viral

La première partie du cycle viral aboutissant à l'établissement du provirus repose presque exclusivement sur les activités enzymatiques virales. En revanche, l'expression du

provirus dépend des systèmes de transcription et de traduction cellulaires. Néanmoins certaines maturations post-traductionnelles sont encore assurées par des protéines virales.

La transcription de l'ARN viral est initiée au niveau de la région R du LTR 5' contenant le TAR (*Tat Responsible Region*) sur lequel Tat va se fixer afin d'initier la transcription. L'ARN polymérase II cellulaire permet la transcription de l'ADN proviral en ARN messagers viraux. Tat régule le processus d'élongation. La transcription produit des ARN viraux précoces (Tat, Rev et Nef) et tardifs (Gag, Env, Vpr, Vpu et Vif). La protéine régulatrice Rev contrôle la production des différents transcrits viraux et les transporte vers le cytoplasme. Ces transcrits servent à la fois d'ARNm pour la synthèse des protéines virales mais également de génome ARN pour de nouvelles particules virales (Pollard and Malim, 1998).

d. Traduction et bourgeonnement

Après transcription, les protéines de l'enveloppe et des éléments structuraux du virion ainsi que les enzymes virales sont traduites. Dans un premier temps, les éléments de la particule virale sont assemblés sous forme de précurseurs polyprotéiques associés à la surface de la cellule hôte. Cela conduit au bourgeonnement et à la libération d'une particule virale dite immature car non infectieuse. Cette particule virale contient deux molécules d'ARN viral issues de la transcription du provirus intégré. Dans un deuxième temps, après libération de cette particule, les protéines virales internes sont réarrangées par la protéase puis réassemblées pour former les éléments internes de la particule (capside, nucléocapside, RT et intégrase) permettant ainsi la génération d'une particule virale mature infectieuse.

B. Les épithéliums

1. Classification

Les muqueuses sont des tissus épithéliaux tapissant les cavités internes du corps. Elles représentent une surface d'échange de plus de 400 m² chez l'homme adulte. Les muqueuses sont constituées d'un épithélium reposant sur un tissu conjonctif dense, le chorion également appelé *lamina propria*. Il existe différents types de muqueuses définies selon l'organisation et la structure des cellules épithéliales qui les constituent (Figure 22).

Les muqueuses sont classées selon :

- la forme des cellules : épithéliums pavimenteux, cubiques, prismatiques ou cylindriques
- le nombre de couches cellulaires : épithéliums monostratifiés ou simples, pluristratifiés, pseudo-stratifiés ou de transition
- la spécialisation cellulaire : présence de microvillosités ou de cils

a. Les épithéliums monostratifiés

Les épithéliums monostratifiés ou simples ne comportent qu'une seule assise cellulaire. Ils sont retrouvés au niveau du tractus gastro-intestinal, du rectum ou de l'endocol de l'utérus. Ces cellules épithéliales sont polarisées. Le pôle muqueux ou apical fait face à la lumière de la muqueuse tandis que le pôle séreux ou basal fait face au chorion et à la circulation sanguine. La polarisation de ces cellules leur confère plusieurs fonctions biologiques : la mise en place d'une barrière étanche face au milieu extérieur et le contrôle des échanges entre la lumière et la circulation sanguine. Les cellules épithéliales sont reliées les unes aux autres par des jonctions serrées. Elles forment ainsi une barrière imperméable et étanche. Cependant, les cellules épithéliales des épithéliums monostratifiés possèdent un mécanisme de trafic intracellulaire leur permettant d'assurer le transport de macromolécules d'un pôle à l'autre. Ce mécanisme particulier de transport vésiculaire est appelé transcytose (Simionescu and Simionescu, 1991). Il a été démontré que certains pathogènes tels que les poliovirus ou *Vibrio cholerae* utilisaient cette voie afin de traverser la barrière intestinale au niveau des cellules M des plaques de Peyer (Siebers and Finlay, 1996; Kerneis et al., 1997; Ouzilou et al., 2002) ou au niveau des entérocytes (Zeng et al., 2004a).

b. Les épithéliums pluristratifiés

Les épithéliums pluristratifiés sont formés d'une multitude de couches (de 20 à 45) de cellules épithéliales. Les épithéliums stratifiés sont divisés en plusieurs types décrits ci-dessous.

- L'épithélium pavimenteux stratifié, également appelé malpighien non kératinisé est retrouvé au niveau de la cavité buccale, du pharynx, de l'œsophage mais également au niveau de l'exocol de l'utérus, du vagin et du canal anal. Au contraire, l'épiderme de la peau est un épithélium malpighien cornéifié.

- L'épithélium pavimenteux cubique stratifié est présent au niveau des glandes sudoripares et assure des fonctions de sécrétion et de protection.

- L'épithélium stratifié cylindrique est présent au niveau du larynx, de la trachée ou de l'utérus.

2. La muqueuse génitale féminine : le col utérin et le vagin

a.1. Organisation de la muqueuse

Le **col utérin** contient deux zones de structures bien distinctes. L'**endocol** s'ouvre sur la cavité utérine et se compose d'un épithélium monostratifié de type glandulaire présentant de nombreux et profonds replis. L'**exocol**, partie externe du col utérin et le vagin sont recouverts d'un épithélium pluristratifié malpighien ne contenant aucune glande. Entre l'endocol et l'exocol de l'utérus se situe la zone de transformation, zone de transition très brutale entre un épithélium monostratifié et pluristratifié.

Le **vagin**, tractus tubulaire long de 10 à 15 cm, relie l'exocol à la vulve, située à l'extérieur de l'organisme. Il existe cinq couches de cellules différentes dans l'épithélium du vagin et de l'exocol (Figure 23):

- une couche de cellules basales profondes, petites et cubiques
- une couche de cellules parabasales, légèrement plus grosses et polyédriques
- une couche de cellules intermédiaires, polygonales
- une couche de cellules superficielles basophiles, très volumineuses
- une couche de cellules superficielles acidophiles aux noyaux pycnotiques.

Comme lors de la différenciation épidermique, les cellules épithéliales vaginales migrent progressivement depuis l'assise basale, se différencient puis desquament. Les cellules les plus superficielles se chargent en glycogène, qui est libéré lors de la desquamation. Ce glycogène est alors transformé en acide lactique par les *Lactobacillus vaginalis*, bactéries saprophytes de la flore vaginale. Cette production d'acide lactique est responsable de l'acidité du vagin (pH de 4,5). L'épithélium repose sur un chorion, riche en vaisseaux sanguins et fibres élastiques.

b. Répartition des cellules du système immunitaire

Des CL et des lymphocytes CD8⁺, majoritairement CD45RO⁺, sont retrouvés au sein de l'épithélium vaginal. Dans le chorion, des lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺, localisés

principalement sous la jonction épithélium/chorion, sont présents ainsi que des macrophages. Au niveau de l'exocol, la répartition des cellules immunitaires est légèrement différente, on y retrouve plus de lymphocytes intraépithéliaux CD4⁺ et de CL (Pudney et al., 2005).

Alors qu'une diminution de l'épaisseur de l'épithélium vaginal intervient au cours du cycle menstruel, aucun changement de densité ni de localisation de cellules immunitaires n'a été observé (Patton et al., 2000; Pudney et al., 2005). Par ailleurs, chez les femmes séropositives, la concentration des lymphocytes intraépithéliaux augmente, le rapport lymphocytes CD4/CD8 s'inverserait tandis que le nombre de CL diminuerait (Olaitan et al., 1996). Ce phénomène est également observé chez les femmes souffrant d'inflammation chronique génitale (Pudney et al., 2005).

3. Les modèles de muqueuses pluristratifiées reconstruites *in vitro*

De nombreux modèles d'épidermes, de dermes et de peaux reconstruites ont été mis au point depuis près de vingt ans. Cependant, malgré les similitudes entre la peau et les muqueuses malpighiennes non kératinisées, peu de modèles de muqueuses reconstruites existent aujourd'hui.

La plupart des modèles de muqueuses décrits à l'heure actuelle sont des substituts de la muqueuse buccale ou gingivale. Ces modèles reconstituent le plus souvent des épithéliums à partir de kératinocytes primaires sur couche nourricière de fibroblastes post-mitotiques (irradiés par des rayons γ à 70 grays ou traités à la mitomycine) (Delcourt-Huard et al., 1997) ou sur des supports biologiques acellulaires (DED, Derme Mort Désépidermisé) (Chung et al., 1997; Cho et al., 2000; Izumi et al., 2000). Des modèles plus complets utilisent comme support des dermes équivalents tels que des lattices de collagène (Gosselin et al., 1990; Hansson et al., 2001). Les modèles de muqueuses reconstruites sont de plus en plus sollicités pour tester des composés actifs et pour les tests de toxicité de composés en cours d'évaluation. La société Skinethic commercialise des modèles de muqueuse gingivale réalisés à partir de cellules primaires de la gencive. De même, la société MatTek propose un modèle de muqueuse buccale et gingivale, EpiOral™.

Contrairement aux muqueuses gingivales, peu de modèles de muqueuses génitales ont été développés. Prémices à ces modèles, les cultures en monocouche de cellules épithéliales immortalisées (Fichorova et al., 2001) ou primaires (Bobardt et al., 2007) ont été utilisées dans

plusieurs études sur le passage du VIH. Malheureusement, de telles cultures en monocouche ne prennent pas en compte l'organisation de la muqueuse vaginale normale. Des modèles en trois dimensions, reconstituant la structure pluristratifiée du vagin se sont alors développés. Le groupe Skinethic commercialise un modèle d'épithélium vaginal reconstruit utilisant des cellules de la lignée A431 de carcinome épidermique. Un modèle similaire a été mis au point récemment à partir de cellules issues de la lignée SiHa (dérivées d'un carcinome cervical) mais intégrant en plus des CL (Cremel et al., 2005). Plus physiologique, des modèles d'épithéliums reconstruits ont été élaborés à partir de cellules épithéliales primaires. Ainsi la société MatTek exploite un modèle de muqueuse vaginale (EpiVaginal™) réalisé sur un support inerte (Ayehunie et al., 2006). Plusieurs variantes existent selon l'ajout ou non de CL. De manière similaire, en utilisant toutefois un support acellulaire (DED), Sivard et coll. en collaboration avec notre équipe ont mis au point un épithélium vaginal intégrant des CL (Sivard et al., 2003). Pour véritablement reproduire la situation physiologique *in vivo*, les modèles doivent à la fois présenter un épithélium et une *lamina propria*. Collins et coll. ont utilisé des explants tissulaires scellés avec de l'agarose comme modèle expérimental de muqueuse vaginale intégrale (Collins et al., 2000). Cependant, un tel modèle présente de nombreuses défaillances : d'une part un manque de reproductibilité lié à l'inter-variabilité individuelle et d'autre part une altération de l'épithélium qui souffre d'hypoxie et se dégrade. Aujourd'hui, seule la muqueuse vaginale reconstruite de la société MatTek EpiVaginal™, épithélium amélioré par la présence d'une matrice de collagène et de fibroblastes, représente le modèle le plus relevant physiologiquement.

Le rôle de barrière représente la fonction principale de tous les épithéliums, quelque soit leur structure ou leur spécialisation. Cette fonction barrière est assurée grâce aux nombreuses jonctions intercellulaires, et plus particulièrement grâce aux jonctions serrées, essentielles au maintien de la cohésion entre les cellules épithéliales.

4. Les jonctions serrées

Les cellules épithéliales adhèrent fortement les unes aux autres. Cette adhésion est médiée, entre autres, par la présence de jonctions serrées. Les jonctions serrées scellent les cellules épithéliales ou endothéliales entre elles, et forment une barrière sélective. En effet, elles permettent la diffusion sélective de protéines et macromolécules dans l'espace intercellulaire. Par ailleurs, elles délimitent les domaines apicaux et basaux des cellules et

maintiennent leur polarité. Enfin, elles jouent un rôle dans d'autres processus cellulaires tels que la prolifération ou la différenciation (Matter and Balda, 2003).

a. Structure et organisation moléculaire des jonctions serrées

Les jonctions serrées se présentent en microscopie électronique comme une série de points de fusion des membranes plasmiques de deux cellules adjacentes nommées « kissing-points » (Figure 24). Ces zones de contact membranaire apparaissent par cryofracture sous forme d'un réseau continu de fibrilles ramifiées et anastomosées (Figure 25). Ces fibrilles sont constituées de protéines transmembranaires, reliant les cellules adjacentes entre elles, associées à des protéines de la plaque cytoplasmique. La liste de protéines impliquées dans les jonctions serrées est déjà longue mais ne cesse de s'allonger ; une liste non exhaustive des principales protéines est présentée ci-dessous.

a.1. Les protéines transmembranaires (Figure 26)

⌘ Occludin

L'Occludin a été la première des protéines transmembranaires des jonctions serrées à être identifiée (Furuse et al., 1993). Elle possède quatre domaines transmembranaires, deux boucles extracellulaires et deux domaines cytoplasmiques. L'étude de souris *Knock-Out* (KO) pour l'Occludin ne révèle aucun développement anormal des jonctions serrées au niveau de l'intestin, ni de défaut de la fonction barrière, mais de multiples anomalies dans divers autres tissus (atrophie testiculaire, inflammation chronique de l'épithélium gastrique par exemple) (Saitou et al., 2000). Le rôle de l'Occludin dans la formation des jonctions serrées reste encore à définir.

⌘ Claudins

Les Claudins composent une famille d'au moins 24 membres. Les Claudin-1 et -2 ont été les premières identifiées en 1998 (Furuse et al., 1998a). Les Claudins ont la même structure que l'Occludin, c'est-à-dire quatre domaines transmembranaires, deux boucles extracellulaires et deux domaines intracellulaires. Ces protéines constituent les fibrilles intercellulaires du complexe des jonctions serrées. Entre deux fibroblastes transfectés par Claudin-1 et -2, dans la zone où les Claudins sont concentrées, la formation de fibrilles intramembranaires apparaît (Furuse et al., 1998b). Les Claudins sont donc essentielles à la

formation des fibrilles transmembranaires des jonctions serrées, en se polymérisant en paires de manière homotypique ou hétérotypique selon les Claudins exprimées (Furuse et al., 1999).

Les fibrilles forment des pores aqueux, à travers l'espace paracellulaire, permettant une diffusion passive de petits solutés tels que des ions. Selon le diamètre de ces pores (0,43 à 0,45 micromètres dans l'intestin) s'opère une sélection des solutés qui passent. Par ailleurs, il a été démontré que les fibrilles peuvent se réorganiser dynamiquement (Sasaki et al., 2003). Cette réorganisation semble être responsable du transport paracellulaire de molécules à travers les jonctions serrées tout en maintenant leur intégrité structurale. La résistance électrique transépithéliale (TEER) permet la détermination de la qualité de la barrière. Cette valeur varie selon les types d'épithéliums et d'endothéliums (de 5 Ohms/cm² à plus de 5000 Ohms/cm²) (Powell, 1981). De manière intéressante, l'augmentation du nombre de fibrilles des jonctions serrées est corrélée à une augmentation logarithmique de la TEER (Claude, 1978).

Les variations observées au niveau des jonctions serrées en fonction des tissus semblent être déterminées par la différence d'expression des Claudins, chaque type cellulaire possédant sa propre composition en Claudins (Morita et al., 1999). Ainsi, deux sous clones de cellules MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) présentent de grandes différences dans leur TEER. Les MDCK de type II, exprimant fortement Claudin-2, ont une valeur de TEER faible contrairement aux cellules MDCK de type I exprimant plus faiblement Claudin-2 mais présentant des valeurs de TEER forte (Furuse et al., 2001). Par ailleurs, l'expression de Claudin-4 dans les MDCK de type II induit une diminution de la conductance (inverse de la résistance) en réduisant la perméabilité au sodium (Van Itallie et al., 2001).

⌘ Junctional Adhesion Molecules (JAM)

Les JAM sont des membres de la superfamille des immunoglobulines. Quatre membres ont été identifiés. Dans les épithéliums, JAM-1 et JAM-3 sont localisés au niveau des jonctions serrées (Aurrand-Lions et al., 2001). Contrairement aux Claudins et à l'Occludin, les JAM ne possèdent qu'un seul domaine transmembranaire et un domaine extracellulaire contenant deux régions variables de type Ig et une queue intracytoplasmique courte contenant le motif de liaison PDZ (Kostrewa et al., 2001). L'interaction des JAM avec d'autres protéines des jonctions serrées semble être primordiale pour la formation et la fonction des

jonctions serrées (Mandell and Parkos, 2005). Par ailleurs, les JAM interviennent dans la migration des leucocytes à travers les endothéliums ou les épithéliums au cours de l'inflammation. Des travaux chez la souris démontrent que JAM-1 régule l'adhésion et la transmigration des monocytes (Martin-Padura et al., 1998), et que JAM-2 et -3 sont également impliqués dans l'adhésion et le flux de leucocytes (Aurrand-Lions et al., 2005; Ludwig et al., 2005).

a.2. Les protéines de la plaque cytoplasmique

⌘ **Zonula Occludens (ZO)**

Les ZO (*Zonula Occludens*) sont des protéines appartenant à la famille des MAGUK (*Membrane Associated Guanylate Kinase*). Il existe trois isoformes de ZO (ZO-1, ZO-2 et ZO-3) qui possèdent toutes trois domaines PDZ, un domaine SH3 (*Src homology 3*) et un domaine GUK (*Guanylate kinase*) (Stevenson et al., 1986; Jesaitis and Goodenough, 1994; Haskins et al., 1998; Gonzalez-Mariscal et al., 1999). Ces protéines contiennent en plus des signaux de localisation nucléaire (Gonzalez-Mariscal et al., 1999).

Les ZO interagissent avec le COOH terminal des Claudins et de l'Occludin *via* leur domaine PDZ (Furuse et al., 1994; Itoh et al., 1999a). ZO-1 peut également se lier à ZO-2 et ZO-3 *via* son second domaine PDZ (Wittchen et al., 1999). Par ailleurs, les ZO se lient à l'actine permettant d'attacher les protéines des jonctions serrées au cytosquelette de la cellule (Itoh et al., 1997; Fanning et al., 1998; Itoh et al., 1999b; Mattagajasingh et al., 2000). Enfin, ZO-1 peut former des complexes avec l'E-cadhérine et des caténines (Itoh et al., 1993; Rajasekaran et al., 1996). Ces complexes se désolidarisent lors de la polarisation cellulaire, les protéines ZO se concentrent alors au niveau des jonctions serrées où elles interagissent avec les protéines transmembranaires (Muller et al., 2005) (Figure 27). De manière très intéressante, Umeda et coll. ont généré des cellules épithéliales dépourvues de toute isoforme de ZO, en utilisant des recombinaisons homologues et des ARN interférences, pour étudier spécifiquement le rôle de ZO dans la formation des jonctions serrées (Umeda et al., 2006). Dans de telles cellules, les jonctions serrées sont inexistantes alors que la polarisation et les jonctions adhérentes sont maintenues. Ils démontrent que, dans des cellules polarisées exprimant des ZO, ZO-1 ou ZO-2 sont nécessaires pour diriger la polymérisation des Claudins et ainsi la formation des jonctions serrées autour des jonctions adhérentes (Umeda et al., 2006).

⌘ Cingulin

La Cingulin, autre protéine cytoplasmique des jonctions serrées, interagit avec les trois isoformes de ZO (Cordenonsi et al., 1999) mais également avec JAM-1 (Bazzoni et al., 2000) et le cytosquelette d'actine (D'Atri and Citi, 2001). L'étude de souris KO pour la Cingulin révèle l'existence de modifications d'expression en ARNm pour de nombreuses protéines des jonctions serrées (Guillemot et al., 2004). La Cingulin jouerait donc également un rôle important dans la régulation de la formation des jonctions serrées en régulant la transcription de ces protéines.

b. Les jonctions serrées dans les épithéliums malpighiens

Il est manifeste que les jonctions serrées sont cruciales pour la formation et le maintien de la fonction barrière ainsi que pour la polarisation des épithéliums simples. Néanmoins, malgré d'anciennes études attestant de la présence de jonctions serrées dans l'épiderme par cryofracture (Hashimoto, 1971; Elias et al., 1977), l'existence de telles structures dans la peau a longtemps été contestée. La présence de jonctions serrées dans l'épiderme n'a été établie que récemment. Alors que la Claudin-1 est retrouvée à la membrane cellulaire de toutes les couches vivantes de l'épiderme, seule la couche granuleuse exprime l'Occludin et la Claudin-4 ; quant à ZO-1, son expression est localisée dans la couche granuleuse et la partie supérieure de la couche spinieuse (Pummi et al., 2001; Brandner et al., 2002; Morita et al., 2004; Schluter et al., 2004) (Pour la nomenclature de l'épiderme se référer à l'encadré « La Peau » au verso de la page 6).

Par ailleurs, les travaux de Furuse et coll. ont permis de mettre en évidence que des souris KO pour Claudin-1 mouraient dès le premier jour par déshydratation (Furuse et al., 2002). De même, une surexpression de Claudin-6 engendre une mort très rapide des souriceaux nouveau-nés par déshydratation (Turksen and Troy, 2002). Chez des patients souffrant d'ichtyose, il a été décelé une mutation délétère dans le gène de la Claudin-1 (Hadj-Rabia et al., 2004). Ainsi, ces études confirment le rôle primordial des jonctions serrées dans l'établissement de la fonction barrière des épithéliums pluristratifiés.

Bien que l'existence de jonctions serrées ait été bien illustrée au niveau de l'épiderme, peu de données sont disponibles actuellement sur leur présence dans d'autres épithéliums pluristratifiés. Langbein et coll. rapportent l'expression des Claudin-1 et -4 ainsi que de l'Occludin et de ZO-1 dans divers épithéliums de bovins (œsophage, vagin, gencive,

museau) (Langbein et al., 2002). Chez l'homme, l'expression de protéines de jonctions serrées a été retrouvée dans l'épithélium cryptal de l'amygdale (Occludin, ZO-1, JAM-1, Claudin-1, -4, et -7) (Go et al., 2004), dans le larynx (Occludin et ZO-1) (Gill et al., 2005), dans la muqueuse nasale (Claudin-1, -4, ZO-1 et JAM) (Takano et al., 2005) ou dans l'exocol de l'utérus (Occludin, ZO-1, Claudin-4) (Zeng et al., 2004b).

c. Expression des protéines des jonctions serrées par les cellules dendritiques

Peu d'études ont rapporté l'expression de protéines des jonctions serrées par les cellules dendritiques. Les travaux de Rescigno et coll. ont pour la première fois démontré que les DC murines exprimaient des protéines des jonctions serrées (Claudin-1, Occludin et ZO-1). Cette observation a permis de mettre en évidence la capacité des DC de la muqueuse intestinale à capturer des antigènes directement dans la lumière intestinale. Lors d'une infection bactérienne, les DC seraient capables d'ouvrir les jonctions serrées de l'épithélium, puis d'envoyer leur dendrites dans la lumière intestinale et ainsi de capturer des antigènes. Ce mécanisme, si remarquable, préserverait totalement l'intégrité de la barrière intestinale, puisque les DC exprimant des protéines des jonctions serrées, pourraient reformer des jonctions serrées avec les cellules épithéliales voisines (Rescigno et al., 2001). Un tel mécanisme est également envisagé dans l'épithélium de la trachée où il a été démontré que les DC Occludin⁺ Claudin-1⁺ migraient hors de l'épithélium tout en maintenant son intégrité (TEER constante) (Ichiyasu et al., 2004). Par ailleurs, une nouvelle population de DC dans l'épithélium bronchial murin, récemment identifiée, CD103 (α_E)- β_7^+ , constituant près de 75 % des DC de cet épithélium co-expriment la langerin, Claudin-1, -7 et ZO-2 (Sung et al., 2006). Enfin, très récemment, une étude de Hauser et coll. rapporte que les CL de la peau de souris expriment Claudin-1, et après migration dans les ganglions lymphatiques conservent leur expression de Claudin-1 (Zimmerli and Hauser, 2007).

Chez l'homme, une seule étude a révélé que les DC HLA-DR⁺ CD11c⁺ de la muqueuse nasale de patients atteints de rhinite allergique expriment Claudin-1. Ces DC, présentes en grande quantité par rapport à une muqueuse normale, pénètrent dans l'épithélium pseudostratifié où sont exprimées l'Occludin, JAM-1 et ZO-1 (Takano et al., 2005).

d. Interaction des jonctions serrées avec le VIH

Les épithéliums forment une des premières barrières protégeant l'organisme contre les agents pathogènes. Les protéines des jonctions serrées peuvent être les cibles ou les récepteurs de facteurs bactériologiques, parasitaires ou viraux. Ainsi, la protéine Derp1, retrouvée dans les excréments des acariens, lyse certaines protéines des jonctions serrées induisant la dislocation des jonctions serrées et ainsi l'accès des particules allergisantes dans l'organisme (Wan et al., 1999; Wan et al., 2001). D'autre part, il a été montré que la liaison et l'endocytose de réovirus est médiée par l'interaction à JAM-1 (Barton et al., 2001). De plus, une très récente étude a identifié Claudin-1 comme co-récepteur viral pour le virus de l'hépatite C (Evans et al., 2007).

Les rares études concernant l'interaction entre les protéines des jonctions serrées et le VIH ciblent uniquement le système nerveux central. Plusieurs pathologies neuro-dégénératives ont en effet été décrites en association avec le VIH. L'encéphalite à VIH et la démence liée au VIH sont caractérisées, entre autres, par une infiltration de cellules monocytaires dans le cerveau. Dans ces deux pathologies, il a été démontré que l'infiltration de cellules mononucléées dans le cerveau des patients infectés était associée à une altération des vaisseaux sanguins du cerveau. Cette altération semble corrélée à la dégradation des jonctions serrées de ces vaisseaux (Dallasta et al., 1999; Boven et al., 2000; Persidsky et al., 2006). Par ailleurs, les travaux du groupe de Toborek ont démontré que la protéine virale Tat affecte l'expression et la distribution de Claudin-1, Claudin-5 (spécifique des endothéliums) et de ZO-1 et ZO-2 (Andras et al., 2003; Andras et al., 2005; Pu et al., 2005). Une autre protéine virale, la gp120, a également été impliquée dans la diminution de la perméabilité de la barrière sanguine cervicale par altération des jonctions serrées (Kanmogne et al., 2005). Malgré ces données intéressantes, les interactions entre le VIH et les jonctions serrées au sein d'autres tissus n'ont pas été documentées.

C. Interaction des cellules dendritiques avec le VIH

L'implication des DC dans l'infection au VIH a été établie depuis près de vingt ans. Deux questions se sont posées assez rapidement. Quelle est la susceptibilité de ces cellules à l'infection ? Quel rôle jouent-elles dans la dissémination du virus dans l'organisme ?

1. Les cellules dendritiques et l'infection par le VIH

a. Infection des cellules dendritiques par le VIH

Il y a plus de 20 ans, suite à l'observation de la réduction du nombre de CL dans la peau de patients séropositifs (Belsito et al., 1984), la question d'une éventuelle implication des DC dans l'infection au VIH et dans le SIDA s'est posée. Quelques années plus tard, des particules de type rétroviral ont été observées par microscopie électronique dans l'espace intercellulaire et bourgeonnant des CL (Rappersberger et al., 1988; Dezutter-Dambuyant et al., 1991) (Figure 28). Parallèlement d'autres travaux ont démontré la susceptibilité des DC myéloïdes du sang au VIH (Patterson and Knight, 1987). Depuis, de nombreuses études ont confirmé la susceptibilité à l'infection des DC myéloïdes (mDC) et également des DC plasmacytoïdes (pDC) *in vitro* ou *in vivo* (Patterson and Knight, 1987; Charbonnier et al., 1995; Patterson et al., 2001; Donaghy et al., 2003). Sont également susceptibles à l'infection les DC des organes lymphoïdes secondaires, les DC du thymus (Beaulieu et al., 1996; Schmitt et al., 2006) et de la rate (Hosmalin et al., 1995; Haase et al., 1996).

Contrairement aux LT CD4⁺, l'infection des DC est peu productive (Cameron et al., 1992a; Pope et al., 1995) et la fréquence d'infection est de 10 à 100 fois inférieure (McIlroy et al., 1995). En effet, chez les patients séropositifs, seules 1,1% des CL sont infectées (Cimarelli et al., 1994) et *in vitro* seulement 1 à 3 % des mDC et pDC sont infectées (Smed-Sorensen et al., 2005). Cependant, ces faibles taux d'infection sont suffisants pour induire une infection productive des LT CD4⁺. En effet, les travaux de Cameron et coll. et Pope et coll. ont clairement démontré que les DC facilitent l'infection des LT notamment par la formation de conjugués LT/DC (Cameron et al., 1992b; Pope et al., 1994; Pope et al., 1995) .

Compte tenu de la faible abondance des DC *in vivo*, les systèmes de culture *in vitro*, permettant d'obtenir des DC phénotypiquement et fonctionnellement très proches de celles observées *in situ*, sont actuellement largement utilisés pour étudier les interactions DC/VIH

in vitro. Ainsi, il a été démontré que les CL générées à partir de précurseurs CD34⁺ (Charbonnier et al., 1996), les DC de type interstitiel générées à partir de précurseurs CD34⁺ ou de monocytes sont infectées *in vitro* (Granelli-Piperno et al., 1998; Canque et al., 1999).

b. Modulation de la susceptibilité des cellules dendritiques à l'infection au VIH

La susceptibilité à l'infection au VIH des DC est fortement influencée par leur stade de maturation. La réplication virale peut être absente, restreinte aux virus de tropisme R5, ou permise aux deux sous-types viraux R5 et X4. En effet, Granelli-Piperno et coll. ont montré que les DC immatures dérivées de monocytes sont infectées de façon productive par des virus de tropisme R5, alors que les DC matures ne répliquent pas le VIH mais sont capables de transmettre l'infection aux LT (Granelli-Piperno et al., 1998). D'autres études ont confirmé que les DC immatures semblent plus sensibles à l'infection que les DC matures (Canque et al., 1999; Sanders et al., 2002). Canque et coll. ont établi que les DC immatures dérivées de précurseurs CD34⁺ répliquent mieux les virus de type R5 que ceux de type X4, tandis qu'aucune restriction tropique n'existe pour les DC matures (Canque et al., 1999). En général, la maturation des DC est associée à une diminution de la réplication virale (Granelli-Piperno et al., 1998; Canque et al., 1999; Bakri et al., 2001) qui peut être liée soit à un blocage dans le processus de transcription inverse (Bakri et al., 2001), soit à une diminution de la fusion du virus à la membrane plasmique (Cavrois et al., 2006). Récemment, il a été établi une forte corrélation entre la susceptibilité à l'infection et l'expression de APOBEC, une déaminase anti-rétrovirale intracellulaire décrite pour sa capacité à conférer aux LT non activés une résistance au VIH (Chiu et al., 2005). En effet, Pion et coll. démontrent que le taux d'expression d'APOBEC3G régit la susceptibilité des DC à l'infection : les DC matures, exprimant trois à cinq fois plus la protéine que les DC immatures, présentent une susceptibilité au VIH réduite (Pion et al., 2006).

c. Modulation des fonctions des cellules dendritiques par l'infection au VIH

Au cours de la maladie SIDA, il a été observé une déplétion des DC du sang chez les patients atteints qui semble être corrélée à la charge virale et au taux de LT CD4⁺ circulants (Macatonia et al., 1990; Grassi et al., 1999; Pacanowski et al., 2001; Soumelis et al., 2001; Donaghy et al., 2001). Cette disparition des DC du sang peut être la conséquence de

plusieurs phénomènes : la non différenciation des précurseurs en DC, la mort des DC due à leur infection ou la relocalisation des DC dans les organes lymphoïdes secondaires (Lore et al., 2002; Patterson et al., 2005).

D'autre part, l'exposition des DC au VIH peut également altérer leurs fonctions. Les données concernant l'effet du VIH sur la maturation des DC myéloïdes sont relativement controversées. Certaines études démontrent un défaut dans l'acquisition des molécules d'activation et de maturation (Granelli-Piperno et al., 2006). Au contraire, d'autres travaux suggèrent que, bien que les DC acquièrent un phénotype mature, elles présentent des défauts dans l'activation des LT et dans la sécrétion de cytokines inflammatoires (Fantuzzi et al., 2004; Smed-Sorensen et al., 2004). Il a également été démontré que les mDC et pDC isolées de patients VIH⁺ perdaient leur capacité à présenter des antigènes à des LT *in vitro* (Macatonia et al., 1992; Donaghy et al., 2003). Au contraire, les travaux sur les pDC démontrent que l'exposition au VIH induit une activation phénotypique et fonctionnelle des pDC, qui, *via* l'interaction de TLR7 avec l'ARN viral produisent de l'IFN α , cytokine à forte activité antivirale (Fonteneau et al., 2004; Beignon et al., 2005). En effet, il a été démontré que TLR7 et TLR8 reconnaissent les simples brins d'ARN du VIH (Heil et al., 2004).

Les divergences dans les résultats concernant la maturation des mDC, en particulier, peuvent être corrélées aux différences dans la taille de l'inoculum et la durée de l'exposition (Harman et al., 2006). En effet, l'ensemble de la littérature actuelle concernant le VIH et ses interactions avec les DC souffre d'une très grande disparité dans les techniques utilisées. Les multiples modèles cellulaires (DC générées *in vitro*, populations de DC isolées *ex vivo*, lignées cellulaires transfectées), et des protocoles d'infection (différentes souches virales, quantité d'inoculum, durée de l'infection) rendent plus difficile la compréhension des mécanismes réels d'interaction entre les DC et le VIH.

2. Attachement, capture et fusion du VIH sur les DC

L'interaction entre le VIH et les DC peut être divisée en plusieurs étapes : (i) liaison du virus à la cellule *via* différents récepteurs de surface et internalisation du virus, (ii) trafic intracellulaire du virus dans les DC, et enfin (iii) transfert du virus et infection des LT CD4⁺ (pour revues (Wilflingseder et al., 2005; Donaghy et al., 2006; Wu and KewalRamani, 2006)).

L'entrée du virus dans la cellule peut se faire par interaction directe avec CD4 et CCR5 et CXCR4 permettant sa fusion avec la membrane plasmique. Les CL et les DC interstitielles des muqueuses ainsi que les pDC expriment CD4 et les deux co-récepteurs viraux CCR5 et CXCR4 (De Panfilis et al., 1990; Zoetewij et al., 1998; Patterson et al., 2001; Tchou et al., 2001). Le niveau d'expression de ces co-récepteurs semble dépendre de la maturation des DC (Zaitseva et al., 1997; Bakri et al., 2001). Par ailleurs, certaines cytokines telles que l'IL-4 ou le TGF- β augmentent l'expression de CXCR4 à la surface des CL (Zoetewij et al., 1998).

L'entrée du virus peut également être médiée par une endocytose récepteur-dépendante. Les **lectines de type C** sont les principaux récepteurs de liaison au VIH après CD4 et les deux co-récepteurs viraux. DC-SIGN, MMR, langerin lient la glycoprotéine gp120 du VIH (Curtis et al., 1992; Turville et al., 2001; Turville et al., 2002) de manière indépendante du tropisme viral. Actuellement, le rôle des lectines de type C dans la capture du VIH par les DC est essentiellement illustré par les études portant sur DC-SIGN et langerin.

Le VIH peut également se lier aux **molécules d'adhésion** exprimées par les DC. Lors de son bourgeonnement à la membrane plasmique, le VIH incorpore sélectivement certaines molécules de l'hôte (Frank et al., 1996), et en particulier les molécules d'adhésion LFA-1, ICAM-1 et ICAM-3 (Fais et al., 1995; Ugolini et al., 1999). Ces molécules d'adhésion augmentent fortement l'infectiosité du virus pour des cellules LFA-1⁺ (Fortin et al., 1997). Par ailleurs, les DC expriment des **récepteurs du complément** et des **fragments Fc des Ig** sur lesquels le virus pourrait se lier *in vitro* et *ex vivo* (Stoiber et al., 1997; Bajtay et al., 2004; Pruenster et al., 2005). Comme dit précédemment, l'opsonisation augmente l'infection des DC ainsi que la transmission aux LT CD4⁺ (Bajtay et al., 2004; Bouhlal et al., 2007).

3. Transfert du VIH aux lymphocytes T CD4⁺

Nous nous intéresserons essentiellement dans ce paragraphe aux DC présentes dans les tissus périphériques c'est-à-dire les CL et les DC interstitielles. Malgré les nombreuses études à ce sujet, les mécanismes précis par lesquels le VIH est transféré aux LT CD4⁺ par les DC restent toujours obscurs. Il semble que ce transfert *in vivo* puisse se produire avec ou sans infection des DC (Figure 29). Turville et coll. ont établi que les DC transfèrent l'infection aux LT durant deux phases distinctes (Turville et al., 2004). Lors de la première phase, les DC immatures et matures transfèrent le virus par **trans-infection**, ou infection en *trans*. Cette trans-infection est caractérisée par la singulière capacité des DC à conserver intact le virus

capturé avant de le transférer aux cellules permissives (Geijtenbeek et al., 2000b). Cette phase est relativement courte (de 0 à 24 heures). La seconde phase intervient plus tard (de 24 à 72 heures) et des virus formés *de novo* dans les DC sont transmis aux LT. Cette phase est appelée **cis-infection** (Turville et al., 2004).

a. Transfert par trans-infection

a.1. Trans-infection via la synapse infectieuse

Actuellement, les mécanismes impliqués dans la trans-infection, et plus particulièrement dans le trafic intracellulaire du VIH sont peu connus. Après liaison à DC-SIGN, le virus serait internalisé dans des compartiments non lysosomiaux à faible pH (Kwon et al., 2002). Plus précisément, Garcia et coll. démontrent que dans les DC matures, le virus est internalisé dans un compartiment d'endocytose de pH 6,2, dénommé endosome viral, riche en tétraspanines (Garcia et al., 2005).

Le contact cellulaire entre les DC et les LT CD4⁺ est nécessaire à la transmission de l'infection (Cameron et al., 1992b). McDonalds et coll. ont démontré que la transmission du VIH s'opère à travers une **synapse infectieuse** notamment en concentrant les virus à la zone de contact entre la DC et la LT CD4⁺ (McDonald et al., 2003). DC-SIGN est également présent au sein de cette synapse infectieuse. L'absence d'expression de DC-SIGN inhibe la trans-infection aux LT (Arrighi et al., 2004a; Arrighi et al., 2004b).

a.2. Trans-infection via des exosomes

L'internalisation du VIH par les DC s'effectue par endocytose de particules virales (Hladik et al., 2007). Cette endocytose du VIH, telle que celle décrite pour l'endocytose du SIV, peut être réalisée dans des puits à clathrine ou par des calvéolines (Frank et al., 2002). Gummuluru et coll. dévoilent que les « radeaux lipidiques » (*lipid rafts*), microdomaines membranaires riches en cholestérol concentrant les facteurs de liaison du virus, jouent un rôle dans la liaison du VIH et dans son internalisation (Gummuluru et al., 2003). Par ailleurs, ils démontrent que la trans-infection pourrait s'effectuer *via* des exosomes (Wiley and Gummuluru, 2006). Dans ce modèle, après endocytose, les particules virales sont transférées aux corps multivésiculaires (MBV, *MultiVesicular Body*). Les particules associées à des exosomes sont alors exocytées dans le milieu extérieur.

b. Cis-infection

L'infection des DC intervient-elle dans la transmission aux LT CD4⁺ ? Bien que la trans-infection semble être le mécanisme principal pour la transmission de l'infection aux LT, l'infection des DC paraît nécessaire à la dissémination de cette infection dans l'organisme. En effet, dans les DC immatures, après 24 heures, les particules virales capturées et internalisées sont massivement dégradées et l'efficacité du transfert viral en *trans* est fortement amoindri (Turville et al., 2004). Par ailleurs, les travaux utilisant des explants de muqueuses infectées montrent que les CL émigrantes de ces muqueuses (deux à trois jours de migration) transfèrent efficacement le VIH à des cellules permissives (Reece et al., 1998; Kawamura et al., 2000). Turville et coll. ont dès lors établi qu'après 24 heures, le transfert du VIH vers les LT s'opère grâce à des particules virales néoformées dans les DC (Turville et al., 2004). Dans ce contexte, la transmission est dépendante de la production de particules virales *de novo* par les DC. Depuis, ce modèle en deux temps a été confirmé par d'autres études *in vitro* (Nobile et al., 2005; Burleigh et al., 2006). DC-SIGN jouerait par ailleurs un autre rôle dans l'infection des DC en augmentant la susceptibilité à l'infection des DC (Lee et al., 2001; Burleigh et al., 2006) par la concentration des particules virales dans les zones membranaires où sont localisés les récepteurs CD4, CCR5 et CXCR4.

c. DC-SIGN, indispensable pour la transmission ?

La majorité des études concernant l'infection des DC et la transmission aux LT s'accordent à donner un rôle prépondérant et indispensable à DC-SIGN dans ce mécanisme. Néanmoins quelques études plus ou moins récentes démontrent que le transfert du VIH et la facilitation de l'infection des LT CD4⁺, plus particulièrement par trans-infection, peut intervenir par un mécanisme indépendant de DC-SIGN (Gummuluru et al., 2002; Wu et al., 2002; Boggiano et al., 2007). Ainsi, DC-SIGN ne représenterait pas un récepteur indispensable pour la transmission du VIH, bien qu'extensivement utilisé et étudié *in vitro*.

Par ailleurs, DC-SIGN n'étant pas constitutivement exprimé par les DC, le VIH peut être capturé et internalisé *via* d'autres récepteurs. En effet, les CL dépourvues de DC-SIGN sont infectées et transmettent l'infection aux LT (Kawamura et al., 2003; Hladik et al., 2007). Les récents travaux de l'équipe de Geijtenbeek examinent le rôle de la langerin des CL dans l'infection par le VIH (de Witte et al., 2007). Dans cette étude utilisant de faibles concentrations virales, il est démontré que le blocage de la langerin induit une augmentation

de la réplication virale dans les CL isolées de peau humaine ainsi qu'une augmentation de leur capacité à transmettre l'infection aux LT CD4⁺. Ainsi, contrairement à son homologue dermique, la langerin préviendrait la transmission de l'infection par les CL en inhibant leur infection.

D. La transmission du VIH au niveau des muqueuses

Bien que le risque de transmission homme–femme ne soit que de 0,002 à 0,02% par acte sexuel et que la muqueuse génitale constitue une barrière protectrice à la transmission, la majorité des nouvelles contaminations au VIH se fait par voie sexuelle. D'autres modes d'infection par voie muqueuse existent, en particulier par le conduit digestif lors de l'ingestion de lait maternel contaminé par exemple. Dans cette transmission par voie sexuelle, des particules virales libres ou des cellules infectées, présentes dans le sperme, sont impliquées (Mermin et al., 1991; Quayle et al., 1997). Au cours de ce chapitre, seront développés essentiellement les aspects concernant les muqueuses génitales et les mécanismes des premières étapes de la transmission trans-muqueuse.

1. Mécanismes de passage à travers les muqueuses

Les mécanismes de traversée des épithéliums dépendent en partie de la structure de l'épithélium. Plusieurs mécanismes possibles ont été établis (Figure 30) :

- (i) détérioration de l'intégrité de la muqueuse
- (ii) infection des cellules épithéliales
- (iii) passage *via* les cellules épithéliales
- (iv) transmigration de cellules infectées
- (v) capture directe ou infection des cellules immunitaires

a. Altération de l'intégrité de l'épithélium

L'altération de la muqueuse génitale facilite l'accès du virus au chorion et ainsi aux cellules cibles du système immunitaire. La détérioration de la barrière épithéliale peut être la conséquence de plusieurs facteurs.

a.1. Microtraumatismes au cours des rapports sexuels

Au cours des rapports, l'épithélium génital peut subir, relativement fréquemment, de minimes altérations. Ainsi, après un rapport sexuel, des microtraumatismes sont détectés dans le tractus génital de près de 60% des femmes (Norvell et al., 1984). Ces micro-lésions sont également visibles sur le gland et sur le prépuce.

a.2. Infections sexuellement transmissibles

De nombreuses études ont établi que la susceptibilité à l'infection ainsi que l'inféctiosité est accrue chez les personnes porteuses d'une IST (Infection Sexuellement Transmissible) telles que l'infection par HSV ou la syphilis (Fleming and Wasserheit, 1999; Rottingen et al., 2001). En effet, ces IST provoquent des lésions ulcéraives. Par ailleurs, la vaginose bactérienne, caractérisée par une modification de la flore vaginale, une augmentation du pH vaginal et une desquamation de cellules épithéliales, mais également les infections par *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* ou par *Trichomonas vaginalis* qui induisent une inflammation génitale, accroissent également la susceptibilité à l'infection par le VIH (Laga et al., 1993; Gray et al., 1997; Nelson et al., 1997; Taha et al., 1998; Martin et al., 1999).

a.3. Modifications de l'épithélium sous l'effet d'hormones

Par ailleurs, sous l'effet de certaines hormones telles que la progestérone, la muqueuse génitale peut subir des transformations structurales favorisant l'accès du VIH. Ainsi, des études chez le macaque montrent que l'administration de progestérone induit un amincissement de l'épithélium vaginal corrélé à l'augmentation de la sensibilité à l'infection par le SIV (Virus de l'immunodéficience Simienne) (Marx et al., 1996; Smith et al., 2000). Chez l'homme, l'implication des contraceptifs hormonaux dans l'infection est plus discutée mais la majorité des études suggère que leur utilisation ne favorise pas le risque d'acquisition du VIH (Martin et al., 1998; Kiddugavu et al., 2003).

b. Infection des cellules épithéliales

Bien que de nombreuses études s'y soient intéressées, l'infection des cellules épithéliales reste aujourd'hui très controversée. La permissivité à l'infection des cellules épithéliales a été observée *in vitro* sur des lignées de cellules intestinales (Bourinbaiar and Phillips, 1991; Fantini et al., 1991) ou cervicales (Tan and Phillips, 1996). De plus, d'anciennes observations réalisées *in situ* chez des patients VIH⁺ avaient permis de visualiser, par des

techniques d'hybridation *in situ*, l'infection de cellules épithéliales intestinales et buccales (Heise et al., 1991; Qureshi et al., 1997).

Au contraire, d'autres études établissent clairement que les cellules épithéliales ne sont pas infectées par le VIH. Les travaux de Dezzutti et coll. et Wu et coll. démontrent, *in vitro*, que les cellules épithéliales cervicales ne sont pas infectées par le VIH. Par contre, ces cellules fixent le virus *via* GalCer ou des héparanes sulfates, et le séquestrent, permettant ainsi un transfert ultérieur de virus infectieux aux cellules du système immunitaire (Dezzutti et al., 2001; Wu et al., 2003). La non infection des cellules épithéliales est confirmée par l'utilisation d'explants de vagin et col utérin humains (Greenhead et al., 2000; Gupta et al., 2002; Sivard et al., 2004) et par des études *in vivo* chez le singe (Spira et al., 1996; Hu et al., 2000). Ces discordances concernant la permissivité à l'infection des cellules épithéliales sont peut-être liées aux divergences d'expression des co-récepteurs viraux CCR5 et CXCR4 par les cellules épithéliales (Dezzutti et al., 2001; Dwinell et al., 1999), à leur origine tissulaire (intestinal, génital et lignées *versus* primaires), à leur architecture (monostratifié *versus* pluristratifié) ainsi que par le mode d'infection utilisé (virus libre *versus* cellules infectées).

c. Transport *via* les cellules épithéliales, la transcytose

Le VIH peut assurer son transport à travers certaines muqueuses par un mécanisme particulier, la **transcytose**. Au sein des épithéliums simples et polarisés tels que l'épithélium intestinal, le VIH est véhiculé à l'intérieur des cellules épithéliales du pôle apical au pôle basolatéral (Bomsel, 1997). Cette transcytose est médiée par la liaison des glycoprotéines d'enveloppe gp120 (Harouse et al., 1995) et gp41 (Bomsel, 1997; Alfsen and Bomsel, 2002) du VIH avec GalCer, fortement exprimé au pôle luminal. Ce mécanisme performant lors de l'infection par des cellules infectées est inefficace avec du virus libre (Alfsen et al., 2005). En effet, les cellules infectées adhèrent à la surface des cellules épithéliales ce qui induit une libération massive de particules virales néosynthétisées au niveau de cette synapse (Alfsen et al., 2005). Les particules virales sont ensuite transportées dans des structures endosomales d'un pôle à l'autre. Récemment, une étude a démontré que le VIH est transmis, bien que faiblement, par transcytose dans les cellules épithéliales génitales (Bobardt et al., 2007). Actuellement, aucune étude ne démontre que la transcytose existe dans les épithéliums pluristratifiés puisque l'étude de Bobardt et coll. utilise des cellules épithéliales issues de frottis, différenciées et cultivées en monocouche.

d. Transmigration de cellules infectées

Comme décrit plus haut, avant d'initier un mécanisme de transcytose de virus libre à travers des cellules épithéliales, les cellules infectées par le VIH adhèrent à ces cellules épithéliales. Cependant, cette étape d'adhésion permet peut-être le passage direct des cellules infectées à travers l'épithélium. L'existence d'un tel mécanisme, bien que minime, a été démontré *in vitro* à travers des épithéliums simples (lignées de cellules utérines ou cervicales) (Carreno et al., 2002; Van Herrewege et al., 2006). Ces études font suite à deux études *in vivo* chez la souris montrant que des cellules mononucléées et non infectées, en particulier des cellules F4/80⁺, sont capables de migrer à travers l'épithélium vaginal, prétraité à la progestérone, jusque dans les ganglions iliaques (Ibata et al., 1997; Zacharopoulos et al., 1997). Un modèle utilisant des cellules infectées a été mis en place chez la souris SCID (dépourvue de lymphocytes T et B), reconstituée avec des lymphocytes humains de sang périphérique. Après une inoculation vaginale non invasive de lymphocytes humains infectés par du VIH de type R5, ces cellules infectées sont détectées dans le vagin dès 4 heures et après 24 heures, elles sont retrouvées dans les ganglions (Di Fabio et al., 2001). Ces études attestent de l'existence d'un possible phénomène de transmigration de cellules infectées à travers un épithélium aminci. Cependant ces résultats, encore préliminaires, ne garantissent pas qu'un tel mécanisme puisse avoir lieu chez l'homme et à travers des épithéliums stratifiés plus épais de type vaginal.

e. Capture par des cellules du système immunitaire

De par leur localisation et leur rôle dans l'induction de la réponse immunitaire, les CL et les DC des muqueuses génitales représentent sans doute les premières cellules cibles dans l'infection par le VIH. Les travaux réalisés chez le macaque infecté intra-vaginalement par le SIV ont permis d'établir la cinétique d'infection et les différentes cellules cibles. Ainsi les cellules SIV⁺ sont principalement des LT, des macrophages ou des DC interstitielles et sont détectées 48 à 72 heures après infection dans la *lamina propria* (Spira et al., 1996; Zhang et al., 1999). L'équipe de Hu et coll. a démontré qu'après 18 heures, des cellules SIV⁺ sont détectées au sein de la muqueuse vaginale et dans les ganglions lymphatiques. Les cellules SIV⁺ sont des CL de l'épithélium vaginal et majoritairement des LT, des DC et des macrophages du chorion (Hu et al., 2000).

Chez l'homme, l'implication des CL a été également illustrée dans des modèles *in vitro* et *ex vivo* de tissus vaginaux ou cervicaux (Reece et al., 1998; Kawamura et al., 2000; Sivard et

al., 2004). Cependant, certaines études ne parviennent pas clairement à détecter les CL comme premières cibles du VIH dans les épithéliums génitaux. Les résultats de Greenhead et coll. et Gupta et coll. démontrent, par immunohistochimie et hybridation *in situ*, que la majorité des cellules infectées sont présentes sous l'épithélium, c'est-à-dire au niveau du chorion et que ce sont principalement des LT ; la détection de CL infectées se faisant plus tardivement (après 96 heures post-infection) (Greenhead et al., 2000; Gupta et al., 2002). Il semble qu'au cours de la primo-infection plusieurs types cellulaires différents soient infectés ou aient capturés le VIH de manière simultanée. En effet, les travaux de Hladik et coll. démontrent qu'après infection, les CL ayant endocytosé le virus et des LT intraépithéliaux infectés migrent conjointement sous forme de conjugués hors du vagin pour disséminer l'infection (Hladik et al., 1999; Hladik et al., 2007).

2. Transmission préférentielle des virus de type R5

Bien que plusieurs sous-type viraux existent (R5, X4 et R5X4), les virus de type R5 sont majoritairement retrouvés au cours des étapes précoces et ce quelque soit le mode de contamination (Zhu et al., 1993; van't Wout et al., 1994). Par ailleurs, des études épidémiologiques ont mis en évidence l'existence d'une délétion de 32 paires de bases dans le gène de CCR5 ($\Delta 32$ CCR5) qui code pour une protéine non fonctionnelle, ne permettant ni fusion virale ni infection de la cellule cible. Les individus homozygotes pour cette mutation présentent une forte résistance à l'infection (Dean et al., 1996; Liu et al., 1996; Samson et al., 1996; Wilkinson et al., 1998). Cependant, des individus homozygotes pour cette mutation ont été dépistés VIH⁺ indiquant que cette protection est incomplète (Balotta et al., 1997; Biti et al., 1997). Certains de ces individus infectés présentent une infection caractérisée essentiellement par la présence de virus de type X4 (Michael et al., 1998; Sheppard et al., 2002). Ces données soulignent le rôle prépondérant de CCR5 et des virus de type R5 dans l'infection au VIH.

De nombreux mécanismes ont été décrits afin d'expliquer cette prépondérance de virus de type R5 lors de l'infection. Les analyses effectuées dans le sperme, tant au niveau des cellules infectées que des particules virales libres, révèlent que les virus de tropisme R5 représentent la population virale majoritaire (van't Wout et al., 1994; Zhang et al., 1998). La transmission préférentielle des virus de type R5 lors d'une primo-infection par voie sexuelle pourrait être liée au pool de virus R5 présents dans le sperme.

D'autre part, la sélection de virus de tropisme R5 peut se faire par le biais d'une expression préférentielle d'un type de co-récepteur viral. Les travaux de Meng et coll. ont mis en évidence, au niveau du jéjunum, une sélection exclusive de virus R5, liée à la non expression de CXCR4 par les cellules épithéliales intestinales (Meng et al., 2002). Au contraire, au niveau du tractus génital, la sélection virale R5 serait induite par la séquestration des virus de tropisme X4 par les cellules épithéliales cervicales (Berlier et al., 2005). En effet, l'expression constitutive de SDF1 α , ligand de CXCR4, par les cellules épithéliales des muqueuses intestinales et génitales induirait une internalisation de CXCR4 (Agace et al., 2000). Enfin, les β -défensines, peptides anti-microbiens exprimés au niveau des épithéliums, inhiberaient la réplication du VIH, et plus particulièrement des virus de type X4 en modulant l'expression membranaire de CXCR4 (Quinones-Mateu et al., 2003)

En définitive, de nombreux mécanismes peuvent potentiellement expliquer la prédominance des virus de type R5 dans l'infection au VIH. Néanmoins, chaque mécanisme ne peut efficacement établir cette discrimination envers les virus de type X4. Celle-ci résulte sans doute de l'addition de multiples facteurs, agissant à différentes étapes de la transmission et de la dissémination virale (Margolis and Shattock, 2006).

3. Prévention de la transmission sexuelle du VIH

a. Les microbicides

Les préservatifs représentent actuellement le moyen le plus efficace de protection contre l'infection par voie sexuelle. Pour pallier la mauvaise utilisation des préservatifs (Pool et al., 2000), de nouveaux outils ont été créés, les microbicides. Les microbicides sont des substances appliquées localement sur les épithéliums génitaux permettant de prévenir, ou tout du moins de réduire la transmission du VIH à travers les tractus génitaux (pour revues (Lederman et al., 2006; McGowan, 2006; Balzarini and Van Damme, 2007)).

Idéalement, ces composés doivent agir sur la majorité des souches de VIH, avoir potentiellement une action sur d'autres agents pathogènes responsables d'IST sans toutefois interagir sur la flore commensale et ne doivent pas endommager les épithéliums génitaux. Plusieurs groupes internationaux se sont formés pour promouvoir le développement des microbicides : Alliance pour le développement des microbicides, Campagne mondiale pour les microbicides, et Partenariat International pour des Microbicides (IPM). L'IPM, par

exemple a été créé en 2002 pour accélérer le développement et l'accessibilité des microbicides fiables et efficaces pour les femmes des pays en voie de développement. Actuellement 60 à 80 microbicides sont en cours de développement, dont une quinzaine sont en phase d'essais cliniques. Les microbicides sont classés selon leur mode d'action (Figure 31).

a.1. Composés qui améliorent les défenses vaginales

La flore vaginale, de pH acide, représente un environnement plutôt hostile aux pathogènes. Néanmoins, cette acidité peut être modifiée (basifiée) lors d'une vaginose bactérienne par exemple. Le liquide sérial de pH alcalin (7,1-8) peut également augmenter le pH vaginal et ainsi la susceptibilité au VIH. Ainsi, des composés permettant de maintenir le pH acide du vagin ont été développés : Acidoform™ et BufferGel™ (van De Wijgert et al., 2001; Amaral et al., 2006).

a.2. Surfactants

Les surfactants, qui sont des détergents, ont été les premiers microbicides à être proposés. Ces composés détruisent les membranes phospholipidiques des pathogènes, mais peuvent également altérer les cellules épithéliales génitales. Des essais cliniques de phase III utilisant le nonoxynol-9 (N-9), issu de la première génération de détergents, ont été brutalement arrêtés puisque les femmes utilisant le gel N-9 présentaient un risque aggravé d'infection au VIH par rapport aux femmes utilisant un placebo (Fichorova et al., 2001 ; Van Damme et al., 2002).

Par la suite, d'autres surfactants ont été développés, dont certains sont actuellement en essais cliniques : Savvy™ (C31G) et Invisible Condom™ (SLS, *Sodium Lauryl Sulfate*). Ces surfactants agissent à la fois comme microbicide et spermicide (Haineault et al., 2003; Patton et al., 2006). Néanmoins, bien que leur efficacité anti-virale ait été démontrée *in vitro* et dans des modèles animaux (Roy et al., 2001; Patton et al., 2006), les essais cliniques ne sont pas toujours poursuivis (Balzarini and Van Damme, 2007). En effet, cette recherche sur les surfactants souffre actuellement des éventuels effets néfastes, tels que ceux retrouvés avec le N-9.

a.3. Agents inhibiteurs d'entrée ciblant l'enveloppe virale

Le premier groupe de ces inhibiteurs d'entrée ciblant l'enveloppe virale comprend des polymères anioniques se liant à l'enveloppe virale grâce à leur charge négative et bloquant

ainsi l'entrée du VIH dans les cellules cibles. Les microbicides cités ci-dessous sont actuellement en cours d'évaluation en essais cliniques de phase III. PRO-2000, polymère de sulfonate de naphthalène, présente une bonne efficacité à la fois dans les modèles *in vitro* (Greenhead et al., 2000; Dezzutti et al., 2004) et dans les modèles animaux (Weber et al., 2001). Le Carraguard™, produit à partir de carragénine d'algues marines couramment utilisée dans l'industrie cosmétique ou alimentaire, bloque la liaison du virus aux cellules cibles (Perotti et al., 2003). Enfin, le sulfate de cellulose, Ushercell™, inhibe l'infection au VIH mais également au virus de l'herpès HSV-1 et -2, au papillomavirus ainsi qu'à des bactéries pathogènes (Simoès et al., 2002; Cheshenko et al., 2004). Malheureusement, en début d'année 2007 et ce malgré les premiers résultats encourageants, deux essais cliniques de phase III ont été interrompu subitement, à encore une fois en raison du nombre plus élevé d'infections dans les groupes utilisant le sulfate de cellulose (déclaration de l'Organisation Mondiale de la Santé, OMS, du 31 janvier 2007).

L'inhibition de l'entrée virale peut également se faire *via* des molécules ciblant les glycoprotéines d'enveloppe gp120 et gp41. Ces glycoprotéines sont les cibles d'anticorps neutralisants, 2G12 (Trkola et al., 1996) et b12 (Burton et al., 1994) spécifiques de gp120 ou 2F5 (Purtscher et al., 1994) et 4E10 (Zwick et al., 2001a) spécifiques de gp41. L'utilisation combinée de ces anticorps permet une neutralisation plus efficace (Zwick et al., 2001b). Par ailleurs, d'autres molécules, PRO-542 ou BMS 378806, analogues ou inhibiteurs spécifiques du site de liaison de CD4 sur gp120 ont été décrits (Moore and Stevenson, 2000; Si et al., 2004). La cyanovirin-N se liant aux résidus mannosylés de l'enveloppe virale prévient ainsi la fusion avec l'enveloppe de la cellule hôte (Boyd et al., 1997). Des études démontrent que cette molécule inhibe efficacement l'infection après application rectale ou vaginale (Tsai et al., 2003; Tsai et al., 2004). Enfin, les inhibiteurs enfuvirtide (T-20) ou C34 se lient à gp41 et bloquent le processus de fusion (Lalezari et al., 2003; Sugaya et al., 2007). Malheureusement, des phénomènes de résistance, liés à la génération de mutants du VIH, peuvent apparaître lors de l'administration de ces agents ciblant les glycoprotéines d'enveloppe (Greenberg and Cammack, 2004; Witvrouw et al., 2005).

a.4. Inhibiteurs d'entrée ciblant la cellule hôte

De nombreuses difficultés sont rencontrées lors du développement de microbicides ciblant des protéines virales et ce essentiellement par l'échappement du virus par le biais de

mutation, problème récurrent de la lutte contre le VIH. Ces problèmes peuvent être évités lors du développement de molécules ciblées sur les cellules de l'hôte. Cependant, le ciblage de récepteurs de l'hôte pourrait modifier des fonctions cellulaires de ces récepteurs. Ces inhibiteurs, tout comme les inhibiteurs de la réplication, ont été développés préalablement comme antirétroviraux administrés pour le traitement des infections chroniques (traitement systémique) des patients séropositifs. Certains sont actuellement testés comme microbicides pour la prévention de l'infection.

L'anticorps monoclonal TNX-355, spécifique de CD4, prévient efficacement l'interaction avec gp120 (Kuritzkes et al., 2004). Par ailleurs, des analogues des co-récepteurs CCR5 et CXCR4 ont été développés. L'application de PSC-RANTES protège efficacement les macaques infectés intra-vaginalement par SIV (Lederman et al., 2004). Le maraviroc®, autre antagoniste de CCR5 du groupe Pfizer (Dorr et al., 2005; Rosario et al., 2005), est en cours d'évaluation clinique de phase III. Au contraire, d'autres études concernant des inhibiteurs de CCR5, aplaviroc® et vicriviroc®, administrés en traitement systémique ont démontré des effets néfastes sur la santé des personnes (toxicité hépatique, développement de tumeurs) (Crabb, 2006). D'autres molécules d'intérêt telles que des anticorps dirigés contre CCR5 (PRO 140, CCR5 mAb004) ont également été décrites (Baba et al., 1999; Trkola et al., 2001). La recherche de molécules ciblant CXCR4 est, contrairement à celle concernant CCR5, peu étendue. En effet, l'utilisation d'antagonistes de CXCR4 présente de nombreux risques comme le suggère les souris déficientes en CXCR4 qui présentent de très sévères anomalies des systèmes vasculaire, cardiaque et hématopoïétique (Tachibana et al., 1998; Zou et al., 1998). Cependant, aujourd'hui, quelques antagonistes de CXCR4 sont à l'étude : T22 (Murakami et al., 1997), AMD 3100 (Schols et al., 1997a; Schols et al., 1997b) et KRH-1636 (Ichiyama et al., 2003).

a.5. Inhibiteurs de la réplication

Une fois le virus entré dans la cellule il faut, pour prévenir la dissémination de l'infection, stopper sa réplication en inhibant soit la RT soit l'intégrase. Plusieurs inhibiteurs de RT, dont certains sont déjà utilisés comme antirétroviraux chez des patients VIH⁺, sont actuellement testés en essais cliniques comme microbicides. L'UC-781 bloque l'infection et la dissémination du VIH à travers le col utérin (Fletcher et al., 2005) et la dapivirine (TMC120), dans un modèle de souris SCID humanisées, prévient la transmission par voie vaginale du VIH (Di Fabio et al., 2003). La dapivirine, administrée sous forme de gel ou par anneau

vaginal, est actuellement testée dans de nombreux essais cliniques (Malcolm et al., 2005). Le tenofovir est également en cours d'essais cliniques (Balzarini and Van Damme, 2007). Des inhibiteurs d'intégrase sont également en cours de développement (Reeves and Piefer, 2005; D'Cruz et al., 2006).

Il est prévisible que le développement d'une protection efficace se fera, non pas par l'utilisation d'un microbicide unique, mais par la combinaison de plusieurs microbicides ciblant préférentiellement différentes étapes du cycle du VIH.

b. La circoncision

La circoncision, très ancienne coutume remontant à l'ère Egyptienne, est pratiquée essentiellement dans un cadre religieux ou dans un cadre médical dans des cas d'infections ou d'anomalies du prépuce. Des études observationnelles ont suggéré une corrélation géographique entre les zones à forte prévalence du VIH et le faible taux d'hommes circoncis en Afrique (Moses et al., 1990; Ronald et al., 1991; Seed et al., 1995). Ces observations ont été appuyées par des études épidémiologiques prouvant qu'il existe une association significative entre circoncision et degré d'infection par le VIH (Weiss et al., 2000; Auvert et al., 2001; Siegfried et al., 2005). Ces résultats ont été largement confirmés par trois études cliniques réalisées en Afrique. Ces études cliniques randomisées ont été arrêtées prématurément, les conclusions certifiant que la circoncision permet une protection face à l'infection par le VIH (efficacité de 51 à 60 %) (Auvert et al., 2005; Bailey et al., 2007; Gray et al., 2007). L'OMS, au vu de ces résultats, a déclaré que la circoncision était un moyen supplémentaire important de réduire le risque de transmission de l'infection du VIH à l'homme (www.who.int). La circoncision semble également avoir des effets bénéfiques chez les femmes : le risque d'infection par le VIH et d'autres agents des IST est diminué (Williams et al., 2006; Gray et al., 2007). Cet effet protecteur de la circoncision sur la transmission homme-femme est en cours d'étude dans un essai clinique mené actuellement en Ouganda.

Différentes hypothèses peuvent expliquer cette protection. D'une part, l'épithélium interne du prépuce est une muqueuse fine et peu kératinisée riche en CL et macrophages, près de neuf fois plus que dans le col utérin. D'autre part, cet épithélium est plus sensible aux microtraumatismes et lésions facilitant l'entrée de pathogènes (Patterson et al., 2002). Chez les hommes circoncis, l'extrémité du pénis, dénué de prépuce est alors recouverte par

un épithélium kératinisé. Enfin il est possible qu'après un rapport sexuel, le prépuce confère un environnement propice à la survie du VIH (McCoombe and Short, 2006). Cependant, malgré ces données biologiques, le mécanisme précis permettant aux hommes circoncis de présenter une susceptibilité amoindrie à l'infection au VIH reste encore inconnu.

Rédaction d'ouvrage

ACTUALITÉS EN BIOLOGIE CUTANÉE

Volume 1



**Colette DEZUTTER-DAMBUYANT
Daniel SCHMITT**



Editions
ESKA

ACTUALITÉS EN BIOLOGIE CUTANÉE

Volume 1

Colette DEZUTTER-DAMBUYANT

Docteur es Sciences, Directeur de recherche 2^e classe Inserm

Daniel SCHMITT

Docteur es Sciences, Directeur de recherche 1^{re} classe Inserm

Cet ouvrage collectif issu du dernier Cours de Biologie de la Peau (Avril 2005), regroupe des données sur la biologie de la peau humaine exposée par les meilleurs spécialistes francophones, experts des différents domaines en recherche dermatologique et immunologique.

La peau a été appréhendée de sa structure à ses fonctions en abordant divers domaines de la physiologie et de la pathologie cutanée. Ainsi, de nouveaux concepts ont été présentés tels que la définition des cellules souches de l'épiderme et le concept de la matrice extra-cellulaire épidermique. Certaines annexes de la peau ont encore beaucoup de secrets à nous dévoiler, tout particulièrement celles abordées dans le cadre de la physiologie de l'appareil unguéal ou de la dynamique du follicule pileux.

Différents domaines de la pathologie cutanée ont été explorés. L'implication de la peau lors d'agressions environnementales par les allergènes ou dans le contexte de l'immunité innée périphérique a été largement étudiée. De même, les dommages induits par les rayonnements ultraviolets au cours du processus de mélanocarcinogenèse ont été présentés. Dans le cadre du nouveau domaine de la neurodermatologie, a été développé l'apport novateur de capteurs cutanés non-invasifs.

Cet ouvrage présente une vision synthétique mais particulièrement prospective des problèmes posés. Complet et didactique, c'est un outil indispensable à la compréhension de la biologie cutanée humaine normale et pathologique, ainsi qu'à la connaissance de nouvelles technologies spécifiques de cette dernière.



12, rue du Quatre-Septembre, 75002 PARIS
Tél. 01 42 86 55 73 – Fax 01 42 60 45 35

<http://www.eska.fr>

ISBN : 978-2-7472-1144-4



9 782747 211444

Marielle Bouschbacher, Estelle Verronese, Jenny Valladeau
EA37-32 UCBL1. Pav. R. Hôpital Édouard Herriot. Place d'Arsonval, 69437 Lyon cedex 03

Les muqueuses représentent la voie principale de contagion et de propagation du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), à la suite d'un contact hétérosexuel ou homosexuel (90 %). En l'absence de lésions de la muqueuse suite à un traumatisme, les mécanismes de dissémination du VIH au travers des muqueuses varient en fonction de leur structure, de leur état, des cellules du système immunitaire résidentes, de la souche virale et du génotype.

La transmission du VIH à travers les muqueuses

Les épithéliums muqueux représentent la porte d'entrée majeure du VIH dans l'organisme. En effet, plus de 95 % des infections surviennent à la suite de rapports sexuels non protégés. Les muqueuses tapissant les cavités internes de l'organisme sont composées essentiellement de cellules épithéliales et d'un chorion ou *lamina propria*, tissu conjonctif très vascularisé. Elles présentent une organisation monostratifiée ou pluristratifiée.

A. Les muqueuses monostratifiées

Les épithéliums monostratifiés ou simples comportent une seule assise cellulaire. Ils sont retrouvés au niveau du tractus gastro-intestinal, rectum ou endocol de l'utérus. Ces cellules épithéliales polarisées (pôle muqueux ou apical face à la lumière de la muqueuse, pôle séreux ou basolatéral face au chorion) sont reliées les unes ou autres par des jonctions serrées et forment ainsi une barrière imperméable. Ces cellules sont dotées d'un mécanisme particulier de transport vésiculaire de macromolécules d'un pôle à l'autre : la transcytose. Il a été démontré que le VIH assure son transport à l'intérieur de l'organisme à travers les muqueuses monostratifiées par ce mécanisme (6). Cette transcytose du VIH à travers les cellules épithéliales des muqueuses monostratifiées est médiée par la liaison des glycoprotéines d'enveloppe gp120 et gp41 du VIH sur un glycosphingolipide fortement exprimé à la surface luminale des cellules épithéliales : le galactosylcéramide (GalCer) (13, 18, 19). Cette infection pourrait se faire par fusion directe des virions avec la membrane plasmique grâce à GalCer ou par fusion des virions dans l'endosome après internalisation par endocytose (2). Par ailleurs, il a été démontré l'existence d'un transport sélectif du virus à travers la muqueuse monostratifiée. En effet, les cellules épithéliales du jéjunum, exprimant GalCer

et CCR5 mais pas CXCR4, transportent exclusivement le virus de type R5 (26).

B. Les muqueuses pluristratifiées

Ces épithéliums assurent essentiellement des fonctions de protection et se caractérisent par la présence au minimum de deux couches cellulaires. Le vagin, l'exocol de l'utérus, l'anus et l'œsophage sont recouverts d'une muqueuse pluristratifiée non kératinisée. Dans ce type de muqueuse, de nombreux types cellulaires coexistent dont les cellules dendritiques (DC) nommées cellules de Langerhans au niveau de l'épithélium.

Des études *in vitro* d'infection de cellules exocervicales humaines (29) ou d'épithéliums buccaux et intestinaux de patients VIH⁺ (20, 32) ont démontré la présence de VIH dans ces épithéliums pluristratifiés et ainsi suggéré que le transport du virus se fasse via l'infection des cellules épithéliales. Au contraire, Collins et coll. démontrent dans un modèle de culture *in vitro* de tissu cervical humain que les virus R5 libres ou associés à des cellules ne peuvent infecter les cellules épithéliales, tout comme le suggèrent également les travaux de Greenhead et coll. (9, 16).

Ainsi, malgré les nombreuses études sur la perméabilité des cellules épithéliales à l'infection par le VIH, les résultats sont toujours divergents.

Les interactions entre VIH et cellules dendritiques

Les DC sont des cellules présentatrices d'antigènes. À l'état immature, elles résident au niveau des tissus périphériques. Après capture de pathogènes, elles s'activent et migrent vers les organes lymphoïdes. Devenues DC matures, elles sont capables d'interagir avec les lymphocytes T et ainsi d'initier une réponse immunitaire adaptative. Dans les muqueuses, deux types de DC immatures sont présentes : les cellules de Langerhans (CL) dans l'épithélium et les DC interstitielles dans la *lamina propria*. Ces DC des épithéliums muqueux ou cutanés, de par leur localisation et leurs fonctions, jouent un rôle important dans la dissémination du VIH. L'interaction entre le VIH et les DC peut être divisée en plusieurs étapes : liaison du virus à la cellule *via* différents récepteurs de surface, internalisation du virus et/ou infection *via* CD4 et un co-récepteur, et enfin migration des DC matures vers les tissus lymphoïdes et infection des lymphocytes (44).

A. Capture du VIH par les cellules dendritiques

La première étape de capture du virus s'effectue par interaction du VIH avec de nombreux récepteurs membranaires des DC. L'attachement du VIH permet de concentrer le virus à la surface cellulaire et ainsi d'augmenter la probabilité d'une interaction entre les protéines virales et CD4. Les DC expriment CD4 ainsi que les corécepteurs au VIH CCR5 et CXCR4 (28, 35). Cependant, des études contradictoires concernant la capacité des cellules de Langerhans à exprimer CXCR4 sont observées. Zaitseva et coll. démontrent que les cellules de Langerhans fraîchement isolées de la peau expriment CCR5 mais pas CXCR4 (45) alors que d'autres soutiennent qu'une expression de CXCR4 est détectée dès leur isolement (39). Par ailleurs, les CL fraîchement isolées sont sensibles à l'infection par les souches virales à tropisme R5 (24). Certaines cytokines ou chimiokines peuvent induire ou inhiber le transport des corécepteurs CCR5 et CXCR4 à la surface cellulaire et ainsi jouer un rôle dans la sélection de la transmission du VIH. Aussi, la production constitutive par les cellules épithéliales de la chimiokine SDF-1, ligand naturel du récepteur CXCR4, serait responsable de l'internalisation de ce dernier bloquant ainsi l'entrée des souches de tropisme X4 (1).

Le virus peut se lier aux DC grâce à différents récepteurs de surface indépendamment de CD4 ou des corécepteurs CCR5 ou CXCR4. Parmi ces molécules dites d'adhésion ou de capture, les lectines de type C interviennent dans la capture de microorganismes pathogènes en général et du VIH. Turville et coll. suggèrent que les lectines des DC jouent un rôle non négligeable dans la capture du VIH (42). Ainsi, les DC du derme et les CL isolées de peau ainsi que leurs homologues *in vitro* fixent préférentiellement la gp120 via les lectines. DC-SIGN, en particulier, exprimé sur les DC de la *lamina propria* peut fixer le VIH des souches R5 et X4 mais ne permet pas l'infection des DC (15, 23). D'autres lectines telles que la Langerin ou le récepteur au mannose interagissent également avec le VIH (12, 42). Enfin, les DC expriment des récepteurs au complément et des Fc récepteurs sur lesquels le virus pourrait se lier *in vitro* et *ex vivo* (31, 37, 38).

Actuellement, les mécanismes d'internalisation du VIH sont encore peu définis. Gummuru et coll. ont montré que les microdomaines membranaires riches en cholestérol, nommés « radeaux lipidiques (*lipid rafts*) » joueraient un rôle dans la liaison du VIH et son internalisation (17). Garcia et coll. démontrent plus précisément que dans les DC matures, le virus est internalisé dans un compartiment d'endocytose intracellulaire non lysosomal de pH 6,2 (14).

B. Infection des cellules dendritiques par le VIH

Des études menées chez le singe infecté par le SIV (*Simian Immunodeficiency Virus*) ont permis de mettre en évidence l'infection des cellules de Langerhans et des macrophages au niveau de l'utérus, du col et du vagin. Après inoculation intravaginale du SIV, les cellules de Langerhans du vagin et du col utérin ainsi que les DC de la *lamina propria* sont les premières cellules infectées (22, 27). 18 à 24 h après l'inoculation, le virus est détectable au niveau des ganglions lymphatiques puis 5 jours plus tard au niveau de la circulation

sanguine (36). Chez l'Homme, des études plus anciennes sont parvenues à démontrer l'implication des cellules de Langerhans dans le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA). L'existence de particules de type rétroviral dans les espaces intercellulaires et autour des cellules de Langerhans a été établie par des études ultrastructurales (33). Des bourgeonnements de type rétroviral ont également été retrouvés sur la membrane plasmique des cellules de Langerhans (12). Les cellules de Langerhans infectées *in vitro* produisent des virions matures de VIH (10) ainsi qu'un relargage d'ARN viral (8). Les DC matures des ganglions peuvent alors transmettre l'infection aux lymphocytes T en formant des syncytia mixtes, favorisant la réplication des virions (30). Dans ce contexte, une étude récente de Loré et coll. ont montré une transmission préférentielle de virion par les DC aux lymphocytes T CD4 spécifiques, et également lorsque les DC ne sont pas infectées de manière productive.

Les cellules dendritiques des chorions exprimant DC-SIGN, possèdent la capacité de conserver le virus intact pendant plusieurs jours avant le transfert à des cellules permissives (41). Cette propriété est appelée infection en *trans*. Ainsi, DC-SIGN n'est pas un récepteur de l'infection de VIH. Il intervient dans la capture du virus puis dans la formation de la synapse infectieuse entre les DC et les lymphocytes T (3). Dans ce contexte, Turville et coll. ont établi que les DC transfèrent l'infection aux lymphocytes T CD4 durant 2 phases distinctes. Lors de la première phase, DC immatures et matures transfèrent le virus via la synapse virologique. Cette phase appelée *trans* infection, dure peu dans le temps (de 0 à 24 heures) et est indifférente du tropisme viral. La seconde phase intervient plus tard et plus longuement (de 24 à 72 heures). Après réplication dans les DC, les nouveaux virions sont transférés. Cette *cis* infection est quant à elle sélective (43).

Bien qu'elles ne soient pas présentes dans les muqueuses normales, les cellules dendritiques dites plasmacytoïdes jouent un rôle fondamental dans l'infection par le VIH. En effet, ces cellules dendritiques particulières d'origine lymphoïde, produisent en réponse à l'infection virale, de forte quantité d'IFN α . Dans ce contexte, la diminution du nombre de ces cellules dans le sang circulant est directement corrélée à une augmentation de la charge virale et à l'apparition de maladies opportunistes (4, 34).

Conclusions et Perspectives

L'une des caractéristiques de l'infection par le VIH est la capacité du virus à échapper au système immunitaire. Les protections locales des muqueuses, par stimulation du système immunitaire à caractère humoral (production d'IgA sécrétoires) ou cellulaire (génération de lymphocytes T cytotoxiques), ne permettent pas de contenir l'infection. Le contrôle de cette pandémie nécessite la mise au point d'un vaccin. À l'heure actuelle, les DC sont les cibles privilégiées des molécules vaccinales visant à stimuler la différenciation des lymphocytes T cytotoxiques, grâce à leur capacité à présenter des antigènes endogènes par un mécanisme de cross-présentation. Dans le cas du VIH, les DC peuvent présenter des antigènes viraux aux lymphocytes T auxiliaires et cytotoxiques spécifiques *in vitro* sur leur Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I (25).

De nombreuses recherches se focalisent également sur l'utilisation d'adjuvant le plus approprié pour activer la réponse immunitaire afin d'éviter l'échappement du VIH au système immunitaire. Plusieurs molécules sont à l'étude dont la sous unité B de la toxine cholérique, la toxine labile d'*Escherichia coli* (21), les motifs ADN CpG (40) ou simplement l'incorporation de cytokines et chimiokines (5). Les vecteurs viraux (PoxVirus ou AdénoVirus) sont largement utilisés dans différents essais de vaccination depuis les années 90. Cependant, devant les faibles résultats obtenus, les essais cliniques actuels s'orientent vers la combinaison de plusieurs approches d'immunisation tels que des vecteurs combinés avec des protéines recombinantes.

Enfin, le challenge le plus important dans l'obtention d'un vaccin contre le SIDA réside également dans la difficulté d'obtenir des anticorps neutralisants. Les travaux de Burton et Desrosiers définissant la structure des anticorps neutralisants, leur mécanisme d'action et la neutralisation d'épitopes sur le virus, constituent une avancée importante dans la compréhension des mécanismes moléculaires permettant de définir les caractéristiques nécessaires et les épitopes à utiliser en vaccination (7, 11).

Références

- Agace, W. W., A. Amara, A. I. Roberts, J. L. Pablos, S. Thelen, M. Ugucioni, X. Y. Li, J. Marsal, F. Arenzana-Seisdedos, T. Delaunay, E. C. Ebert, B. Moser, and C. M. Parker. 2000. Constitutive expression of stromal derived factor-1 by mucosal epithelia and its role in HIV transmission and propagation. *Curr Biol* 10:325-8.
- Alfsen, A., and M. Bomsel. 2002. HIV-1 gp41 envelope residues 650-685 exposed on native virus act as a lectin to bind epithelial cell galactosyl ceramide. *J Biol Chem* 277:25649-59.
- Arrighi, J. F., M. Pion, E. Garcia, J. M. Escola, Y. van Kooyk, T. B. Geijtenbeek, and V. Piguet. 2004. DC-SIGN-mediated infectious synapse formation enhances X4 HIV-1 transmission from dendritic cells to T cells. *J Exp Med* 200:1279-88.
- Beignon, A. S., K. McKenna, M. Skoberne, O. Manches, I. Dasilva, D. G. Kavanagh, M. Larsson, R. J. Gorelick, J. D. Lifson, and N. Bhardwaj. 2005. Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor- viral RNA interactions. *J Clin Invest* 115:3265-3275.
- Berzofsky, J. A., J. D. Ahlers, and I. M. Belyakov. 2001. Strategies for designing and optimizing new generation vaccines. *Nat Rev Immunol* 1:209-19.
- Bomsel, M. 1997. Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat Med* 3:42-7.
- Cardoso, R. M., M. B. Zwick, R. L. Stanfield, R. Kunert, J. M. Binley, H. Katinger, D. R. Burton, and I. A. Wilson. 2005. Broadly neutralizing anti-HIV antibody 4E10 recognizes a helical conformation of a highly conserved fusion-associated motif in gp41. *Immunity* 22:163-73.
- Charbonnier, A. S., F. Mallet, M. M. Fiers, C. Desgranges, C. Dezutter-Dambuyant, and D. Schmitt. 1994. Detection of HIV-specific DNA sequences in epidermal Langerhans cells infected in vitro by means of a cell-free system. *Arch Dermatol Res* 287:36-41.
- Collins, K. B., B. K. Patterson, G. J. Naus, D. V. Landers, and P. Gupta. 2000. Development of an in vitro organ culture model to study transmission of HIV-1 in the female genital tract. *Nat Med* 6:475-9.
- Delorme, P., C. Dezutter-Dambuyant, A. Ebersold, C. Desgranges, J. Thivolet, and D. Schmitt. 1993. In vitro infection of epidermal Langerhans cells with human immunodeficiency virus type 1 (HTLV-IIIb isolate). *Res Virol* 144:53-8.
- Desrosiers, R. C. 2004. Prospects for an AIDS vaccine. *Nat Med* 10:221-3.
- Dezutter-Dambuyant, C., D. A. Schmitt, N. Dusserre, D. Hanau, H. V. Kolbe, M. P. Kieny, J. P. Cazenave, D. Schmitt, J. L. Pasquali, R. Olivier, and et al. 1991. Interaction of human epidermal Langerhans cells with HIV-1 viral envelope proteins (gp 120 and gp 160s) involves a receptor-mediated endocytosis independent of the CD4 T4A epitope. *J Dermatol* 18:377-92.
- Fantini, J., N. Yahi, S. Baghdiguan, and J. C. Chermann. 1992. Human colon epithelial cells productively infected with human immunodeficiency virus show impaired differentiation and altered secretion. *J Virol* 66:580-5.
- Garcia, E., M. Pion, A. Pelchen-Matthews, L. Collinson, J. F. Arrighi, G. Blot, F. Leuba, J. M. Escola, N. Demareux, M. Marsh, and V. Piguet. 2005. HIV-1 trafficking to the dendritic cell-T-cell infectious synapse uses a pathway of tetraspanin sorting to the immunological synapse. *Traffic* 6:488-501.
- Geijtenbeek, T. B., D. S. Kwon, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duinhoven, J. Middel, I. L. Cornelissen, H. S. Nottet, V. N. KewalRamani, D. R. Littman, C. G. Figdor, and Y. van Kooyk. 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100:587-97.
- Greenhead, P., P. Hayes, P. S. Watts, K. G. Laing, G. E. Griffin, and R. J. Shattock. 2000. Parameters of human immunodeficiency virus infection of human cervical tissue and inhibition by vaginal virucides. *J Virol* 74:5577-86.
- Gummuluru, S., M. Rogel, L. Stamatos, and M. Emerman. 2003. Binding of human immunodeficiency virus type 1 to immature dendritic cells can occur independently of DC-SIGN and mannose binding C-type lectin receptors via a cholesterol-dependent pathway. *J Virol* 77:12865-74.
- Han, Y., C. L. Ventura, K. P. Black, J. E. Cummins, Jr., S. D. Hall, and S. Jackson. 2000. Productive human immunodeficiency virus-1 infection of epithelial cell lines of salivary gland origin. *Oral Microbiol Immunol* 15:82-8.
- Harouse, J. M., R. G. Collman, and F. Gonzalez-Scarano. 1995. Human immunodeficiency virus type 1 infection of SK-N-MC cells: domains of gp120 involved in entry into a CD4-negative, galactosyl ceramide/3' sulfo-galactosyl ceramide-positive cell line. *J Virol* 69:7383-90.
- Heise, C., S. Dandekar, P. Kumar, R. Duplantier, R. M. Donovan, and C. H. Salsted. 1991. Human immunodeficiency virus infection of enterocytes and mononuclear cells in human jejunal mucosa. *Gastroenterology* 100:1521-7.
- Holmgren, J., J. Adamsson, F. Anjuere, J. Clemens, C. Czerkinsky, K. Eriksson, C. F. Flach, A. George-Chandy, A. M. Harandi, M. Lebens, T. Lehner, M. Lindblad, E. Nygren, S. Raghavan, J. Sanchez, M. Stanford, J. B. Sun, A. M. Svennerholm, and S. Tengvall. 2005. Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA. *Immunol Lett* 97:181-8.
- Hu, J., M. B. Gardner, and C. J. Miller. 2000. Simian immunodeficiency virus rapidly penetrates the cervicovaginal mucosa after intravaginal inoculation and infects intraepithelial dendritic cells. *J Virol* 74:6087-95.
- Jameson, B., F. Baribaud, S. Pohlmann, D. Ghavimi, F. Mortari, R. W. Doms, and A. Iwasaki. 2002. Expression of DC-SIGN by dendritic cells of intestinal and genital mucosae in humans and rhesus macaques. *J Virol* 76:1866-75.
- Kawamura, T., F. O. Gulden, M. Sugaya, D. T. McNamara, D. L. Borris, M. M. Lederman, J. M. Orenstein, P. A. Zimmerman, and A. Blauvelt. 2003. R5 HIV productively infects Langerhans cells, and infection levels are regulated by compound CCR5 polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8401-6.
- Maranon, C., J. F. Desoutter, G. Hoeffel, W. Cohen, D. Hanau, and A. Hosmalin. 2004. Dendritic cells cross-present HIV antigens from live as well as apoptotic infected CD4+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6092-7.
- Meng, G., X. Wei, X. Wu, M. T. Sellers, J. M. Decker, Z. Moldoveanu, J. M. Orenstein, M. F. Graham, J. C. Kappes, J. Mestecky, G. M. Shaw, and P. D. Smith. 2002. Primary intestinal epithelial cells selectively transfer R5 HIV-1 to CCR5+ cells. *Nat Med* 8:150-6.
- Miller, C. J., and J. Hu. 1999. T cell-tropic simian immunodeficiency virus (SIV) and simian-human immunodeficiency viruses are readily transmitted by vaginal inoculation of rhesus macaques, and Langerhans' cells of the female genital tract are infected with SIV. *J Infect Dis* 179 Suppl 3:S413-7.
- O'Doherty, U., R. M. Steinman, M. Peng, P. U. Cameron, S. Gezelter, I. Kopeloff, W. J. Swiggard, M. Pope, and N. Bhardwaj. 1993. Dendritic cells freshly isolated from human blood express CD4

- and mature into typical immunostimulatory dendritic cells after culture in monocyte-conditioned medium. *J Exp Med* 178:1067-76.
29. Phillips, D. M., V. R. Zacharopoulos, X. Tan, and R. Pearce-Pratt. 1994. Mechanisms of sexual transmission of HIV: does HIV infect intact epithelia? *Trends Microbiol* 2:454-8.
 30. Pope, M., D. D. Ho, J. P. Moore, J. Weber, M. T. Dittmar, and R. A. Weiss. 1997. Different subtypes of HIV-1 and cutaneous dendritic cells. *Science* 278:786-8.
 31. Pruenster, M., D. Wilflingseder, Z. Banki, C. G. Ammann, B. Muellauer, M. Meyer, C. Speth, M. P. Dierich, and H. Stoiber. 2005. C-type lectin-independent interaction of complement opsonized HIV with monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 35:2691-8.
 32. Qureshi, M. N., C. E. Barr, I. Hewlitt, R. Boorstein, F. Kong, O. Bagasra, L. E. Bobroski, and B. Joshi. 1997. Detection of HIV in oral mucosal cells. *Oral Dis* 3 Suppl 1:S73-8.
 33. Rappersberger, K., S. Gartner, P. Schenk, G. Stingl, V. Groh, E. Tschachler, D. L. Mann, K. Wolff, K. Konrad, and M. Popovic. 1988. Langerhans' cells are an actual site of HIV-1 replication. *Intervirology* 29:185-94.
 34. Soumelis, V., I. Scott, F. Gheyas, D. Bouhour, G. Cozon, L. Cotte, L. Huang, J. A. Levy, and Y. J. Liu. 2001. Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood* 98:906-12.
 35. Sozzani, S., M. Locati, D. Zhou, M. Rieppi, W. Luini, G. Lamorte, G. Bianchi, N. Polentarutti, P. Allavena, and A. Mantovani. 1995. Receptors, signal transduction, and spectrum of action of monocyte chemoattractant protein-1 and related chemokines. *J Leukoc Biol* 57:788-94.
 36. Spira, A. I., P. A. Marx, B. K. Patterson, J. Mahoney, R. A. Koup, S. M. Wolinsky, and D. D. Ho. 1996. Cellular targets of infection and route of viral dissemination after an intravaginal inoculation of simian immunodeficiency virus into rhesus macaques. *J Exp Med* 183:215-25.
 37. Stoiber, H., A. Clivio, and M. P. Dierich. 1997. Role of complement in HIV infection. *Annu Rev Immunol* 15:649-74.
 38. Stoiber, H., M. Pruenster, C. G. Ammann, and M. P. Dierich. 2005. Complement-opsonized HIV: the free rider on its way to infection. *Mol Immunol* 42:153-60.
 39. Tchou, I., L. Misery, O. Sabido, C. Dezutter-Dambuyant, T. Bourlet, P. Moja, H. Hamzeh, J. Peguet-Navarro, D. Schmitt, and C. Genin. 2001. Functional HIV CXCR4 coreceptor on human epithelial Langerhans cells and infection by HIV strain X4. *J Leukoc Biol* 70:313-21.
 40. Trabattoni, D., A. Clivio, D. H. Bray, L. Bhagat, S. Beltrami, G. Maffei, E. Cesana, P. Lowry, F. Lissoni, E. R. Kandimalla, T. Sullivan, S. Agrawal, R. Bartholomew, and M. Clerici. 2005. Immunization with gp120-depleted whole killed HIV immunogen and a second-generation CpG DNA elicits strong HIV-specific responses in mice. *Vaccine*.
 41. Trumpfheller, C., C. G. Park, J. Finke, R. M. Steinman, and A. Granelli-Piperno. 2003. Cell type-dependent retention and transmission of HIV-1 by DC-SIGN. *Int Immunol* 15:289-98.
 42. Turville, S. G., P. U. Cameron, A. Handley, G. Lin, S. Pohlmann, R. W. Doms, and A. L. Cunningham. 2002. Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat Immunol* 3:975-83.
 43. Turville, S. G., J. J. Santos, I. Frank, P. U. Cameron, J. Wilkinson, M. Miranda-Saksena, J. Dable, H. Stossel, N. Romani, M. Piatak, J.-R., J. D. Lifson, M. Pope, and A. L. Cunningham. 2004. Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood* 103:2170-9.
 44. Wilflingseder, D., Z. Banki, M. P. Dierich, and H. Stoiber. 2005. Mechanisms promoting dendritic cell-mediated transmission of HIV. *Mol Immunol* 42:229-37.
 45. Zaitseva, M., A. Blauvelt, S. Lee, C. K. Lapham, V. Klaus-Kovtun, H. Mostowski, J. Manischewitz, and H. Golding. 1997. Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nat Med* 3:1369-75.

Remerciements : Nous souhaitons remercier vivement l'Agence Nationale pour la Recherche contre le SIDA, et le Sidaction pour leur soutien financier et scientifique. Nous remercions également le Dr Colette Dezutter-Dambuyant pour ses précieux conseils et son soutien permanent.

Chapitre 2 : Résultats et Discussion

1. EXPRESSION DES RECEPTEURS DE L'IMMUNITE INNEE PAR LES CELLULES DENDRITIQUES CUTANEEES

A. Article 1: Langerhans cells express a specific TLR profile and differentially respond to viruses and Gram-positive bacteria

Flacher Vincent, Bouschbacher Marielle, Verronèse Estelle, Massacrier Catherine, Sisirak Vanya, Berthier-Vergnes Odile, de Saint-Vis Blandine, Caux Christophe, Dezutter-Dambuyant Colette, Lebecque Serge et Valladeau Jenny

Journal of Immunology 2006, 177 (11) :7959.

Depuis leur découverte en 1868 par Paul Langerhans, les cellules de Langerhans (CL) ont été beaucoup étudiées. Cependant, malgré les nombreux travaux réalisés, leur rôle précis dans l'immunité cutanée reste encore controversé. En analysant l'expression de leurs récepteurs de l'immunité innée ainsi que leur réponse à différents stimuli, nous pourrions mieux comprendre le rôle potentiel de ces cellules dans l'immunité cutanée.

Les récepteurs *Toll-Like* (TLR) représentent une famille de protéines transmembranaires de type I impliquées dans la reconnaissance de *Pathogen Associated Molecular Pattern* (PAMP). Après liaison avec leur ligand, les TLR ont la capacité à induire une cascade de signalisation conduisant à l'activation de gènes de cytokines pro- ou anti-inflammatoires et de gènes de molécules de co-stimulation. Actuellement 10 TLR ont été décrit chez l'homme. TLR1, 2, 4, 5 et 6 reconnaissent principalement des composés d'origine bactérienne. TLR3, 7, 8 et 9 sont, quant à eux, spécialisés dans la reconnaissance d'acides nucléiques ; TLR3 majoritairement dans la reconnaissance d'ARN doubles brins, TLR7 et 8 d'ARN simples brins et TLR9 d'ADN doubles brins et plus spécifiquement de motifs CpG non méthylés. Enfin, le ligand de TLR10 n'a pas été encore identifié.

Chez l'homme, chaque population de DC exprime un profil différent de TLR. Ainsi, les DC myéloïdes expriment fortement TLR1, 2, 3 et 8 et plus faiblement TLR5, 6 et 10. Les DC plasmacytoïdes expriment fortement TLR7 et 9 et plus faiblement TLR1, 6 et 10. Quand nous

avons débuté ce travail, l'expression des TLR sur les populations de DC des tissus de revêtement, et en particulier sur les CL n'était pas défini. Certains ligands de TLR sont actuellement utilisés en traitement de certains cancers cutanés comme l'imiquimod ou comme adjuvant dans le développement de vaccin comme les motifs d'ADN CpG. Ainsi, la connaissance des TLR exprimés par les CL sera d'une très grande importance puisqu'elle permettra, entre autres, de mieux cibler les CL dans des protocoles d'immunothérapie.

L'objectif de ce travail a donc été de déterminer le profil des TLR exprimés par les CL ainsi que leur réponse face à leurs ligands. Nous avons établi dans ce travail, et pour la première fois que les CL humaines, fraîchement isolées de peau humaine, expriment les ARNm des TLR1, TLR2, TLR3, TLR6, TLR10 et faiblement TLR5. En parallèle, nous avons analysé l'expression des TLR par les kératinocytes humains non différenciés et démontré qu'ils expriment les ARNm des TLR1-5, TLR7 et TLR10. Nous avons confirmé l'expression de TLR fonctionnel par l'étude de l'activation des CL en réponse à des ligands spécifiques de chaque TLR. Nous avons ainsi observé que les CL, en réponse à PGN, sécrètent de l'IL-10, indiquant une potentielle tolérance vis-à-vis des bactéries commensales Gram⁺. Au contraire en réponse à Poly(IC), les CL produisent majoritairement de l'IL-6 et du TNF- α .

Human Langerhans Cells Express a Specific TLR Profile and Differentially Respond to Viruses and Gram-Positive Bacteria¹

Vincent Flacher,^{2*} Marielle Bouschbacher,[†] Estelle Verronè,[†] Catherine Massacrier,^{*} Vanja Sisirak,[‡] Odile Berthier-Vergnes,[†] Blandine de Saint-Vis,^{*} Christophe Caux,^{*‡} Colette Dezutter-Dambuyant,[†] Serge Lebecque,^{3*} and Jenny Valladeau^{4†}

Dendritic cells (DC) are APCs essential for the development of primary immune responses. In pluristratified epithelia, Langerhans cells (LC) are a critical subset of DC which take up Ags and migrate toward lymph nodes upon inflammatory stimuli. TLR allow detection of pathogen-associated molecular patterns (PAMP) by different DC subsets. The repertoire of TLR expressed by human LC is uncharacterized and their ability to directly respond to PAMP has not been systematically investigated. In this study, we show for the first time that freshly purified LC from human skin express mRNA encoding TLR1, TLR2, TLR3, TLR5, TLR6 and TLR10. In addition, keratinocytes *ex vivo* display TLR1–5, TLR7, and TLR10. Accordingly, highly enriched immature LC efficiently respond to TLR2 agonists peptidoglycan and lipoteichoic acid from Gram-positive bacteria, and to dsRNA which engages TLR3. In contrast, LC do not directly sense TLR7/8 ligands and LPS from Gram-negative bacteria, which signals through TLR4. TLR engagement also results in cytokine production, with marked differences depending on the PAMP detected. TLR2 and TLR3 ligands increase IL-6 and IL-8 production, while dsRNA alone stimulates TNF- α release. Strikingly, only peptidoglycan triggers IL-10 secretion, thereby suggesting a specific function in tolerance to commensal Gram-positive bacteria. However, LC do not produce IL-12p70 or type I IFNs. In conclusion, human LC are equipped with TLR that enable direct detection of PAMP from viruses and Gram-positive bacteria, subsequent phenotypic maturation, and differential cytokine production. This implies a significant role for LC in the control of skin immune responses. *The Journal of Immunology*, 2006, 177: 7959–7967.

Dendritic cells (DC)⁵ are APCs that are required for initiation of specific T cell-driven immune responses (1). DC residing in nonlymphoid tissue, such as Langerhans cells (LC) in the epidermis, are immature cells whose primary function is to capture Ag. This function is principally achieved through specialized surface-membrane endocytic structures. Concomitant with Ag processing in specialized organelles of the endocytic pathway, DC, upon exposure to pathogen-associated molecular patterns (PAMP) (2), undergo a series of phenotypic modifications, termed maturation, and migrate to secondary lymphoid tissue. The maturation of DC results in expression of surface MHC class II and costimulatory molecules, which eventually

translates into highly efficient presentation, by the appropriate MHC molecules, of processed Ag to T cells (1).

The TLR represent a family of germline-encoded type I transmembrane proteins which are essential to the recognition of PAMP by the innate immune system (3). Ten human TLR have been described so far. Upon engagement of TLR, signal transduction events are initiated by the cytoplasmic Toll/IL-1R domain. Depending on which TLR is engaged, a specific set of transcription factors (including AP-1, IFN response factors, and NF- κ B) is activated, subsequently inducing expression of proinflammatory cytokines, chemokines, and costimulatory molecules (4, 5).

TLR recognize a wide array of molecules whose origin can be bacterial, viral, or parasitic. TLR2 and its associated receptors TLR1 and TLR6 are mainly involved in the detection of molecules from mycobacteria and Gram-positive bacteria (6, 7). Some PAMP, such as lipoteichoic acid (LTA), only require TLR2 (7). In contrast, TLR1 and TLR2 together detect triacylated lipoproteins (8), whereas TLR2 associates with TLR6 to recognize diacylated lipoproteins and peptidoglycans (PGN) (9, 10). Like TLR1 and TLR6, TLR10 is highly homologous to TLR2 and is probably another TLR2-associated receptor, but its function is still unknown (11). TLR4 is the receptor for LPS, a characteristic component of the cell wall of Gram-negative bacteria (12). Flagellin, a protein typical of flagellated bacteria, is specifically identified by TLR5 (13). Finally, TLR3, TLR7, TLR8, and TLR9 are intracellular receptors for nucleic acids (4). Indeed, when detected in vesicular compartments where these TLR reside, RNA and DNA characterize bacterial uptake or viral infection. TLR3 recognizes dsRNA which constitute a viral genome or are generated during viral replication. TLR7 and TLR8 are engaged by viral ssRNA and by synthetic small molecules mimicking features of nucleic acids, such as imiquimod and R-848. Finally, TLR9 recognizes oligodeoxynucleotides (ODN) containing unmethylated CpG motifs (CpG

*Laboratory for Immunological Research, Schering-Plough, Dardilly, France; [†]Université Claude Bernard–Lyon I, Centre Hospitalier Edouard Herriot, Lyon, France; and [‡]Centre Léon Bérard, Lyon, France

Received for publication March 15, 2006. Accepted for publication September 11, 2006.

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

¹ V.F. was the recipient of a grant from the Fondation Marcel Mérieux. M.B. was the recipient of a grant from the Association Nationale de Recherche sur le Sida. J.V. was supported by the Association Nationale de Recherche sur le Sida, the Sidaction, and the Société Française de Dermatologie.

² Current address: Department of Dermatology, Innsbruck Medical University, Innsbruck, Austria.

³ Current address: Service de Pneumologie, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Pierre-Bénite, France.

⁴ Address correspondence and reprint requests to Dr. Jenny Valladeau, Université Claude Bernard–Lyon I, EA3732, Centre Hospitalier Edouard Herriot, Dermatologie-Pavillon R, 69437 Lyon cedex, France. E-mail address: valladeau@lyon.inserm.fr

⁵ Abbreviations used in this paper: DC, dendritic cell; LC, Langerhans cell; PAMP, pathogen-associated molecular pattern; LTA, lipoteichoic acid; PGN, peptidoglycan; ODN, oligodeoxynucleotide; mDC, myeloid DC; pDC, plasmacytoid DC; rRNA, ribosomal RNA; CBA, cytometric bead array; PI, propidium iodide.

ODN), which are underrepresented in mammalian genomes, but abundant in viral and bacterial DNA.

Hence, TLR have the capacity to directly initiate maturation of DC exposed to potentially pathogenic microorganisms (2). Interestingly, in humans, striking differences exist in TLR expression from one DC subset to another. In the blood, DC of myeloid origin (mDC) display TLR1–6, TLR8, TLR10, and low levels of TLR7, whereas plasmacytoid DC (pDC), which are the main producers of type I IFNs following viral challenge, only express TLR1, TLR6, TLR10, and very high levels of TLR7 and TLR9 (14–17). This restricts their reactivity to a defined pattern of PAMP and, consequently, pathogens.

The distribution of TLR in human skin is incompletely defined. Several studies demonstrated that keratinocytes differentiated *in vitro* display TLR and respond to corresponding PAMP by producing proinflammatory cytokines (18–22). Some discrepancies remain, though, which likely result from differences in culture conditions. In contrast, the TLR expression pattern of freshly isolated human LC has never been systematically examined (23). Moreover, because *ex vivo* purification of LC by positive selection of CD1a⁺ cells from human skin is sufficient to drive a significant spontaneous maturation (24), it has been proven difficult to monitor PAMP-induced maturation of fresh LC (25). In this report, we analyze the expression pattern of the 10 identified human TLR in freshly isolated LC and keratinocytes. Furthermore, an extraction procedure based on gradient density centrifugation allowed us to avoid spontaneous phenotypic maturation and to address the issue of maturation and cytokine production of LC exposed to defined PAMP known as TLR agonists.

Materials and Methods

Media and reagents

The medium used was RPMI 1640 with Glutamax (Invitrogen Life Technologies), supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Flow Laboratories), penicillin, and streptomycin (referred to as complete medium). *Staphylococcus aureus* PGN was obtained from Fluka. Poly(I:C), *Escherichia coli* LPS (strain 011:B4), and *Bacillus subtilis* LTA were obtained from Invivogen Life Technologies. Imiquimod was purchased from Sequoia Research Products. CpG ODN 2216 was obtained from MWG Biotech. R-848 was synthesized at the Schering-Plough Research Institute. PGN, LTA, imiquimod, and R-848 were shown to be free of endotoxin, as determined by a *Limulus*-Amoebocyte Assay (BioWhittaker).

LC isolation from human skin

Human epidermal cell suspensions were obtained from normal skin of patients undergoing abdominal reconstructive plastic surgery after patients' informed consent and according to institutional guidelines. Skin was split-cut with a keratome set and the dermoepidermal slices were treated for 18 h at 4°C with 0.05% trypsin (Sigma-Aldrich) in HBSS without Ca²⁺ and Mg²⁺ (Seromed; Biochrom). The epidermis was detached from the dermis with fine forceps. Epidermal cell suspensions were obtained by subsequent tissue dissociation and filtration through sterile gauze. Basal keratinocytes were removed by adhesion on collagen-coated plates (Corning-Iwaki Glass). Enrichment was obtained by two consecutive density gradient centrifugations on Lymphoprep (Nycomed Pharma), which yielded 75.0 ± 8.4% CD1a⁺ LC based on 10 experiments. For quantitative PCR and some activation experiments, LC were further purified by positive selection using anti-CD1a MACS (Miltenyi Biotec). The CD1a-negative fraction contained suprabasal keratinocytes. The LC fraction obtained by this technique was >95% positive for CD1a expression.

DC isolation from human blood

Blood samples of healthy donors were obtained according to institutional guidelines. PBMC were isolated by Ficoll-Hypaque centrifugation (Eurobio). The CD19⁺ B cells and CD14⁺ monocytes were removed from the sample by CD19 and CD14 MACS purification using MiniMACS separation columns (Miltenyi Biotec). The remaining cells were further enriched in MiniMACS columns using microbeads coated with anti-BDCA-1 or anti-BDCA-4 mAbs (BD Biosciences), thereby selecting mDC and pDC,

respectively. Reanalysis of the sorted populations showed purity higher than 98%.

Analysis of TLR expression by real-time quantitative PCR

Total RNA was extracted using an RNeasy Mini kit (Qiagen) and treated with DNase I (Qiagen) for 15 min at room temperature. Then RNA was reverse transcribed using a mix of random hexamer primers (Invitrogen Life Technologies), oligo(dT)₁₅ (Promega), and Superscript II RNase-H reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies). Real-time quantitative PCR was set up in an Icyler IQ (Bio-Rad), using TaqMan Universal PCR Master Mix, no AmpErase UNG (Applied Biosystems), in a final volume of 25 μl (0.4 μM of each primer, 0.2 μM TaqMan probe, and 25 ng of cDNA). Experiments were performed in triplicates. Primers and probes of TLR and the CD4 promoter were designed using Primer 3 software (Whitehead Institute), with a melting temperature of ~60°C for primers and ~70°C for probes. Sequences and dyes are detailed in Table I. The absence of genomic DNA contamination was controlled using human CD4 promoter probe. cDNAs were normalized to 18S ribosomal RNA (rRNA) with the TaqMan Ribosomal RNA Control Reagents (Applied Biosystems). Real-time data were acquired and analyzed using Icyler IQ Optical System software (Bio-Rad) with automatic adjustment of the baseline and threshold parameters. Gene expression levels were determined using cycle threshold values, directly transferred on the PCR standard curve, and transformed into copy numbers. Results are expressed as copy numbers of a specified gene for 10⁵ copies of 18S rRNA.

Activation of LC by TLR agonists

Freshly extracted LC were incubated for 24 or 48 h with TLR agonists or with CD40L transfected L cells. Briefly, 10⁵ murine Ltk⁻ fibroblastic L cells stably transfected with the human *CD40L* gene (26) were irradiated at 7500 rad, then seeded together with 5 × 10⁵ LC. Alternatively, LPS (1 μg/ml), PGN (10 μg/ml), LTA (10 μg/ml), poly(I:C) (25 μg/ml), R-848 (10 μM), imiquimod (25 μM), or CpG ODN 2216 (10 μg/ml) were added to the culture medium.

Cytofluorimetric analysis

Cells were labeled with FITC-conjugated anti-CD1a, -CD86, -CD80 (DakoCytomation), -CD25, -CD83 (Beckman Coulter). Indirect stainings with anti-DC-LAMP/CD208 (Beckman Coulter) or anti-TLR3 (clone 713E4; Abcys) were revealed by goat anti-mouse IgG-FITC (DakoCytomation). For intracytoplasmic phenotyping (DC-LAMP and TLR3), cells were stained in Fix&Perm reagent (DakoCytomation), following manufacturer's instructions. Negative controls were performed with isotype-matched control Abs. Fluorescence was determined with a FACScan flow cytometer (BD Biosciences) and data were analyzed using the CellQuest software (BD Biosciences).

Cytokine production

Freshly purified LC (10⁶ cells/ml) were cultured for 24 or 48 h with TLR agonists at the indicated concentrations. As a control for IFN-α production, blood pDC (5 × 10⁵ cells/ml) were incubated for 24 h with 20 ng/ml IL-3 (R&D Systems), or formaldehyde-inactivated influenza virus (five cases, 1 hemagglutinin unit/ml; strain A/New Caledonia/20/99 IVR116; Aventis-Pasteur). TNF-α, IL-6, IFN-α, and IFN-β levels were evaluated in the cell culture supernatants using commercially available ELISA kits (TNF-α and IL-6, R&D Systems; IFN-α, Abcys; IFN-β, Fujirebio). Cytokines were quantified relative to a standard curve representing a range of dilutions of recombinant cytokines. IL-10 and IL-8 levels were evaluated using cytometric bead array (CBA) assays (BD Biosciences). Following acquisition of sample data by flow cytometry, results were analyzed using the BD Biosciences CBA analysis software. Standard curves, plotted using the mean fluorescence intensity of the beads for cytokine values ranging from 0 to 5000 pg/ml, were used for quantifying cytokines.

Results

Isolation of immature human LC

To analyze LC activation, we used an isolation technique based on two consecutive density gradients, as previously described (24). This procedure permitted to obtain 75.0 ± 8.4% purity as revealed by CD1a staining. Contaminant cells appeared as large, CD1a-negative cells (Fig. 1A). Pluristratified epithelia such as the epidermis are constituted of basal, dividing keratinocytes and suprabasal, differentiated keratinocytes. As basal keratinocytes were

Table I. Sequences of primers and probes used for real-time quantitative PCR^a

Gene	Forward Primer (5'-3')	TaqMan Probe	Reverse Primer (5'-3')
TLR1	CCC ATT CCG CAG TAC TCC AT	[5' ^{FAM}] AGC TCA AAA GTC TCA TGG CCA GGA GGA [3' ^{TAM} RA]	TTT TCC TTG GGC CAT TCC A
TLR2	CCC ATT GCT CTT TCA CTG CT	[5' ^{FAM}] GTA GTT GTG GGT TGA AGC ACT GGA CAA T [3' ^{TAM} RA]	CCT CCT TGG AGA GGC TGA TG
TLR3	TGG TTG GGC CAC CTA GAA GTA	[5' ^{FAM}] ACC TGG GCC TTA ATG AAA TTG GGC AA [3' ^{TAM} RA]	TCT CCA TTC CTG GCC TGT G
TLR4	CTG CAA TGG ATC AAG GAC CA	[5' ^{FAM}] AGG CAG CTC TTG GTG GAA GTT GAA CG [3' ^{TAM} RA]	TTA TCT GAA GGT GTT GCA CAT TCC
TLR5	TGC CTT GAA GCC TTC AGT TAT G	[5' ^{HEX}] CCA GGG CAG GTG CTT ATC TGA CCT TAA CA [3' ^{TAM} RA]	CCA CCA CCA TGA TGA GAG CA
TLR6	CCC TCA ACC ACA TAG AAA CG	[5' ^{HEX}] ACC GAC TTG GAA ATG CCT GGT CAG [3' ^{TAM} RA]	GAG ATA TTC CAC AGG TTTT GG
TLR7	TTA CCT GGA TGG AAA CCA GCT ACT	[5' ^{HEX}] AGA TAC CGC AGG GCC TCC CGC [3' ^{TAM} RA]	TCA AGG CTG AGA AGC TGT AAG CTA
TLR8	AAC TTT CTA TGA TGC TTA CAT TTC TTA TGA C	[5' ^{FAM}] CCA AAG ATG CCT CTG TTA CTG ACT GGG TG [3' ^{TAM} RA]	GGT GGT AGC GCA GCT CAT TT
TLR9	TGA AGA CTT CAG GCC CAA CTG	[5' ^{FAM}] AGC ACC CTC AAC TTC ACC TTG GAT CTG TC [3' ^{TAM} RA]	TGC AGG GTC ACC AGG TTG T
TLR10	TTT GAT CTG CCC TGG TAT CTC A	[5' ^{HEX}] AGG TCA ATG CAC ACA AAC ATG GCA CA [3' ^{TAM} RA]	AGT TGT TCT TGG GTT TTT CTA AC
CD4 promoter	TTC CAC ACT GGG CCA CCT AT	[5' ^{FAM}] CAC TGG ACA CAA TTG CCC TCA GG [3' ^{TAM} RA]	TTG TGG GCT TAC CAC TGC TTG

^a The quencher dye, TAMRA, was placed at the 3' end of probes. The reporter dyes, linked to the 5' end, were HEX, FAM, or VIC (18S ribosomal RNA).

previously excluded by a collagen adhesion step, contaminant cells therefore represent differentiated suprabasal keratinocytes.

Propidium iodide (PI) stainings showed that $69.1 \pm 10.1\%$ of LC cultured for 24 h were viable, whereas $<50\%$ of LC were still viable after 48 h of culture (Fig. 1A and data not shown). In this context, we used 24 h of maturation and FACS results were gated on PI-negative cells.

Gradient-purified LC had an immature phenotype, as demonstrated by the lack of CD25, CD83, or CD80, and low CD86 staining at day 0. The intracellular maturation marker DC-LAMP was also absent (Fig. 1B). During extraction from the skin, disruption of critical interactions of LC with keratinocytes and degradation of the extracellular matrix may be directly or indirectly sensed by LC (27). These events are probably sufficient to initiate a spontaneous maturation, which is observed after 1 day of culture as judged by a limited up-regulation of LC surface markers. Indeed, following a 24 h incubation in medium alone, expression of the maturation markers CD83 and DC-LAMP, and the costimulatory molecules CD80 and CD86 was increased (Fig. 1B). Interestingly, CD25 was only slightly increased by the spontaneous maturation and was therefore of particular interest. Considering that CD86 was rapidly up-regulated in the majority of LC, we based our analysis of this marker on mean fluorescence intensity rather than percentages of positive cells. Due to biological variability, spontaneous maturation judged by the percentage of CD83⁺ cells was observed on $51.8 \pm 9.2\%$ of LC after 24 h of culture. However, engagement of CD40 by CD40L-expressing fibroblasts resulted in an increased expression of costimulatory and maturation markers, showing that this modest spontaneous maturation does not preclude further activation of LC (Fig. 1B).

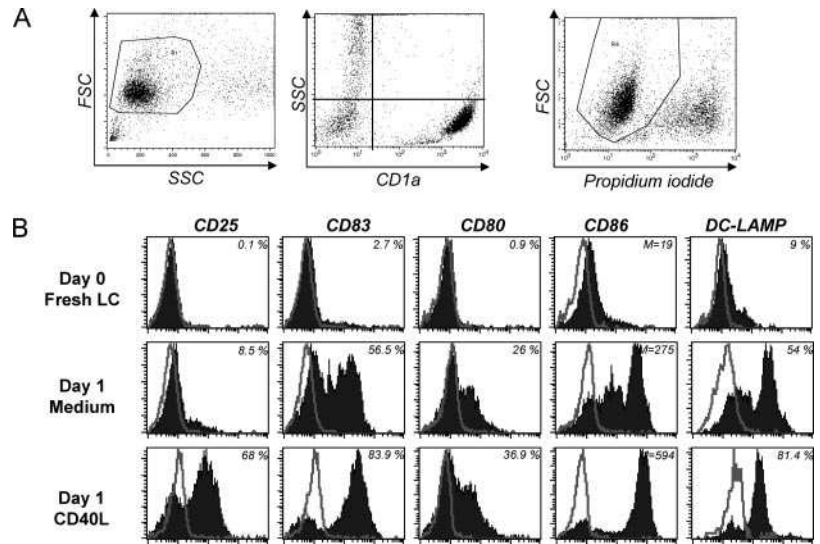
Freshly isolated LC are devoid of TLR4 and do not directly respond to LPS

Expression of TLR by DC is a key element to explain their capacity to respond to many danger signals. The constitutive low expression of TLR proteins (28) and the poorly defined specificity of most of the commercially available Abs against TLR proteins (personal observations) currently make PCR the most reliable way to systematically analyze expression of these receptors. Therefore, we evaluated mRNA expression of the 10 known TLR on LC by real-time quantitative PCR, using specific primers and probes (Table I). Of note, the high sensitivity of this technique enables the detection of very low levels of TLR mRNA, which may not be sufficient to express adequate amounts of functional protein. Because the pattern of expression of functional TLR was thoroughly described in human blood mDC and pDC (14–17), we used these DC populations as a reference to determine the level of significance of PCR results. Our data regarding TLR displayed by blood DC was consistent with the literature (see below).

Because primary keratinocytes also display TLR (18, 22, 29, 30), we used magnetic beads purification of CD1a⁺ LC and investigated TLR expression of suprabasal keratinocytes (i.e., CD1a⁻ fraction) in parallel. To avoid the strong spontaneous maturation that results from this isolation technique (Ref. 24 and our unpublished data), RNA extraction was performed immediately after purification.

Direct recognition of LPS by a given cell type requires expression of TLR4 (12). Keratinocytes and mDC expressed comparable levels of TLR4 transcripts (Fig. 2A), which suggests that keratinocytes, like mDC, respond to LPS (16, 31). In contrast, no TLR4 mRNA was detected in LC and pDC (Fig. 2A). To further demonstrate the absence of functional TLR4, gradient-purified LC were incubated for 24 h with LPS. Even in the presence of a high dose (1 μg/ml) of LPS, only marginal increases of maturation

FIGURE 1. Immature LC purified ex vivo exhibit an immature phenotype and mature following CD40 triggering. LC were enriched by gradient purification as described in *Materials and Methods*, then analyzed by flow cytometry. *A*, Freshly isolated LC were gated as PI-negative, CD1a-positive cells. *B*, Freshly isolated LC were stained with anti-CD25, -CD83, -CD80, -CD86, or -DC-LAMP mAbs (filled histograms) or isotype-matched negative control Abs (open histograms). LC were also stained after 24 h of culture (day 1) in medium alone or in the presence of CD40L-expressing fibroblasts. Percentages of positive cells or mean fluorescence intensity (M) are shown in the *upper right corner* of the histograms. Results are representative of at least eight independent experiments.



markers (CD25, CD83, DC-LAMP) and of costimulatory molecules (CD80, CD86) were consistently observed (Fig. 2*B*). Therefore, we conclude that freshly isolated human LC are unable to directly sense LPS.

LC display TLR1, TLR2, and TLR6, and TLR2 agonists trigger LC maturation

We next investigated expression of TLR2 and its associated receptors, TLR1, TLR6, and TLR10, which are notably involved in the detection of Gram-positive bacteria (7). Real-time PCR analysis showed that LC expressed TLR1, TLR2, TLR6, and TLR10 mRNA, whereas keratinocytes displayed mRNA for TLR1, TLR2, and TLR10. It is noteworthy that LC had particularly high levels of TLR1 mRNA as compared with pDC and mDC (Fig. 3*A*), while TLR10 mRNA expression was much weaker in keratinocytes and LC than in both blood DC subsets. Expression of TLR2 mRNA in LC was weak, as compared with blood mDC, but was confirmed using different primer sets (data not shown and Ref. 23). Moreover, in line with the literature, TLR2 was not detectable in pDC (14–16). Therefore, we considered the low levels of TLR2 mRNA expressed by LC as significant. This was confirmed by exposure of LC to TLR2 agonists. Indeed, we cultured gradient-purified LC for

24 h in the presence of PGN and LTA and found that TLR2 agonist PGN reproducibly up-regulated expression of maturation markers, while LTA induced weaker activation, based on CD25 staining (Fig. 3*B*).

TLR3 is functionally expressed on purified LC

TLR3 is a receptor for dsRNA and is therefore thought to play a critical role in the detection of many viruses (4). Similar to Kadowaki et al. (15) who demonstrated that responsiveness of blood mDC to dsRNA correlates with TLR3 expression, we found that mDC, but not pDC, expressed high levels of this receptor. Strikingly, keratinocytes presented constitutive levels of TLR3 mRNA that were even higher than in mDC (Fig. 4*A*).

TLR3 mRNA expression in highly purified LC was 10-fold higher than in the dsRNA unresponsive pDC (Fig. 4*A*) (15). FACS analysis confirmed that TLR3 is expressed intracellularly in human LC (Fig. 4*B*). Finally, activation assays definitively stated that LC display functional TLR3: a particularly strong increase of CD25, CD83, CD80, CD86, and DC-LAMP expression was observed following 24 h of incubation with poly(I:C), a synthetic dsRNA analog (Fig. 4*C*). Thus, LC can be directly and potently activated by viral dsRNA.

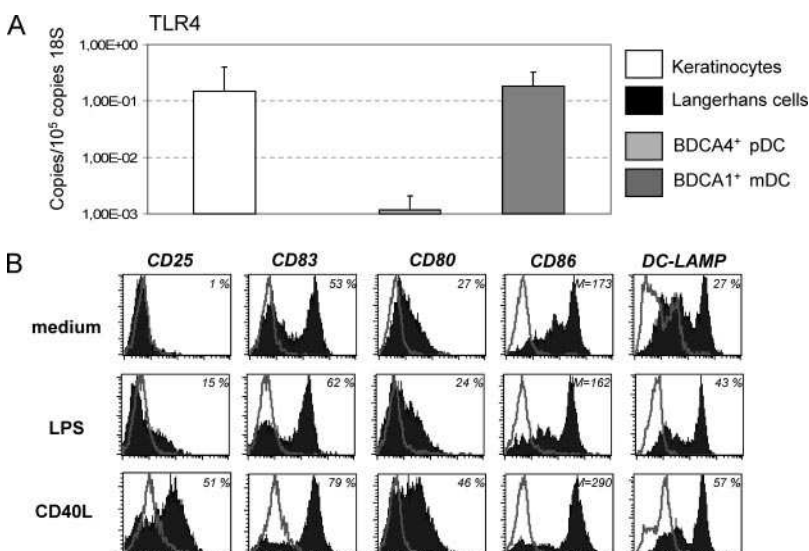
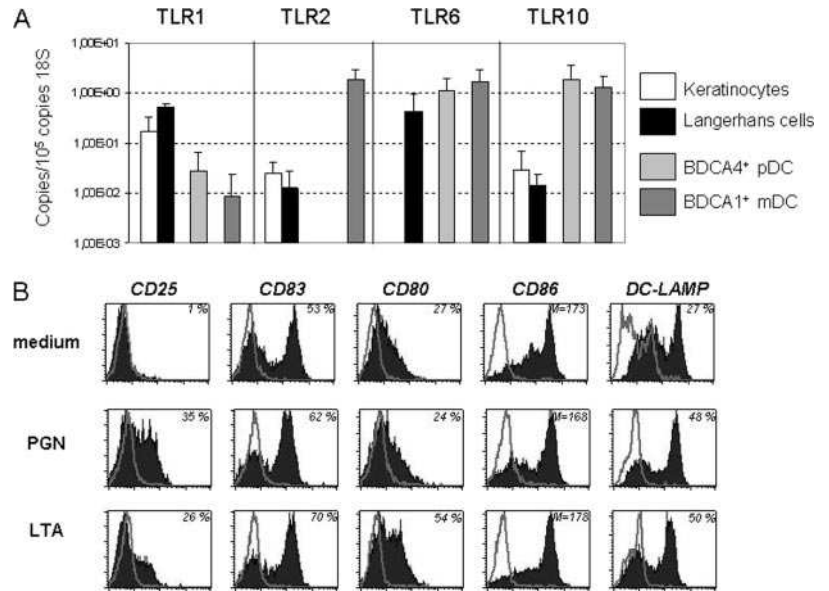


FIGURE 2. Human LC do not express TLR4 and are unresponsive to LPS. *A*, Real-time quantitative PCR for TLR4 was performed on cDNA obtained from keratinocytes, MACS-purified CD1a⁺ LC, BDCA-4⁺ blood pDC, and BDCA-1⁺ blood mDC. Results were expressed as copy numbers for 10⁵ copies of 18S rRNA. *B*, Gradient-purified LC were cultured in medium alone with 1 μ g/ml LPS or with CD40L-transfected L cells. Twenty-four hours later, cells were harvested and stained with anti-CD25, -CD83, -CD80, -CD86, and -DC-LAMP mAbs (filled histograms) or isotype-matched negative control Abs (open histograms). Percentages of positive cells or mean fluorescence intensity (M) are shown in the *upper right corner* of the histograms. Results are representative of three independent experiments.

FIGURE 3. Human LC express TLR2 as well as accessory receptors TLR1 and TLR6 and mature in the presence of PGN and LTA. *A*, Real-time quantitative PCR for TLR1, TLR2, TLR6, and TLR10 were performed on cDNA obtained from keratinocytes, MACS-purified CD1a⁺ LC, BDCA-4⁺ blood pDC, and BDCA-1⁺ blood mDC. Results were expressed as copy numbers for 10⁵ copies of 18S rRNA. *B*, Gradient-purified LC were cultured in medium alone or with 10 μg/ml PGN or 10 μg/ml LTA. Twenty-four hours later, cells were harvested and stained with anti-CD25, -CD83, -CD80, -CD86, or -DC-LAMP mAbs (filled histograms) or isotype-matched negative control Abs (open histograms). Percentages of positive cells or mean fluorescence intensity (M) are shown in the *upper right corner* of the histograms. Results are representative of three independent experiments.



TLR7, TLR8, and TLR9 are absent from LC, while keratinocytes express TLR7

TLR7, TLR8, and TLR9 belong to a subgroup of the TLR family (32). This classification is primarily based on sequence similarity and closely related signal transduction pathways. Moreover, TLR7/8/9 are intravesicular receptors of nucleic acids (DNA or RNA oligonucleotides) or structurally related synthetic compounds (imiquimod, R-848).

Real-time PCR analysis revealed very low signals for TLR7 in LC; in contrast, keratinocytes exhibited ~10 times more mRNA for this receptor, which was present at levels comparable to mDC (Fig. 5A) (17). Consistent with this, the response of mDC and keratinocytes to the specific TLR7 agonist imiquimod was previously established (17, 33). TLR8 mRNA was detected in keratinocytes, LC, and pDC at comparable intensities (Fig. 5A). Never-

theless, pDC were frequently demonstrated to be devoid of TLR8 (14–17) and a TLR8-specific agonist is unable to activate pDC (34). Consequently, we considered the low levels of TLR8 expressed by keratinocytes and LC as nonsignificant. Finally, the last member of this subgroup, TLR9, was not detected in LC by real-time PCR and keratinocytes expressed TLR9 mRNA at levels similar to mDC, which are known to be unresponsive to CpG ODN (14–17) (Fig. 5A).

We next used activation assays to further establish the absence of functional TLR7, TLR8, and TLR9 in LC. For this purpose, we used synthetic agonists specific for TLR7 (imiquimod), for both TLR7 and TLR8 (R-848), or for TLR9 (CpG ODN 2216). As expected, expression of maturation markers was equivalent in LC cultured in medium alone or incubated with imiquimod, R-848, or CpG (Fig. 5B), thereby revealing that these cells do not express functional TLR7, TLR8, or TLR9 proteins.

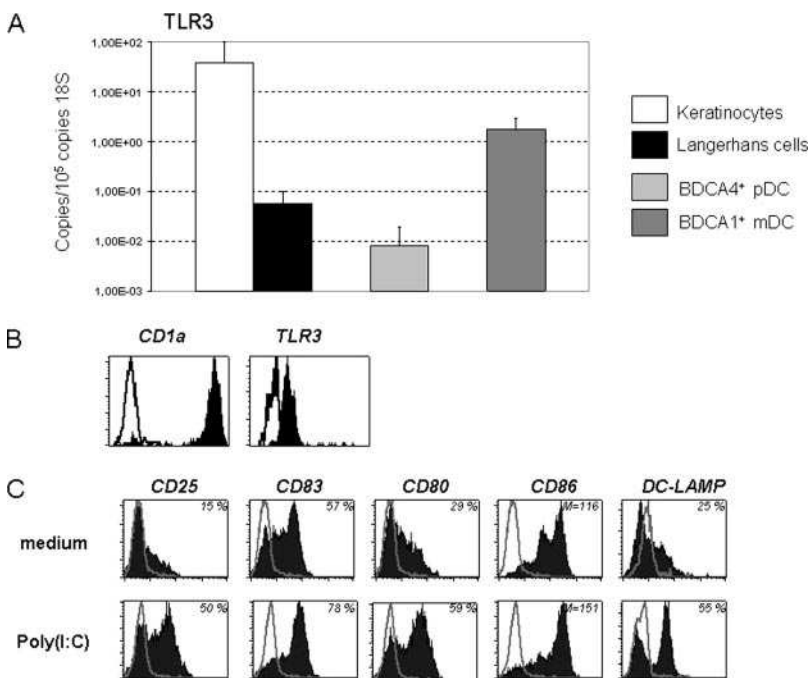
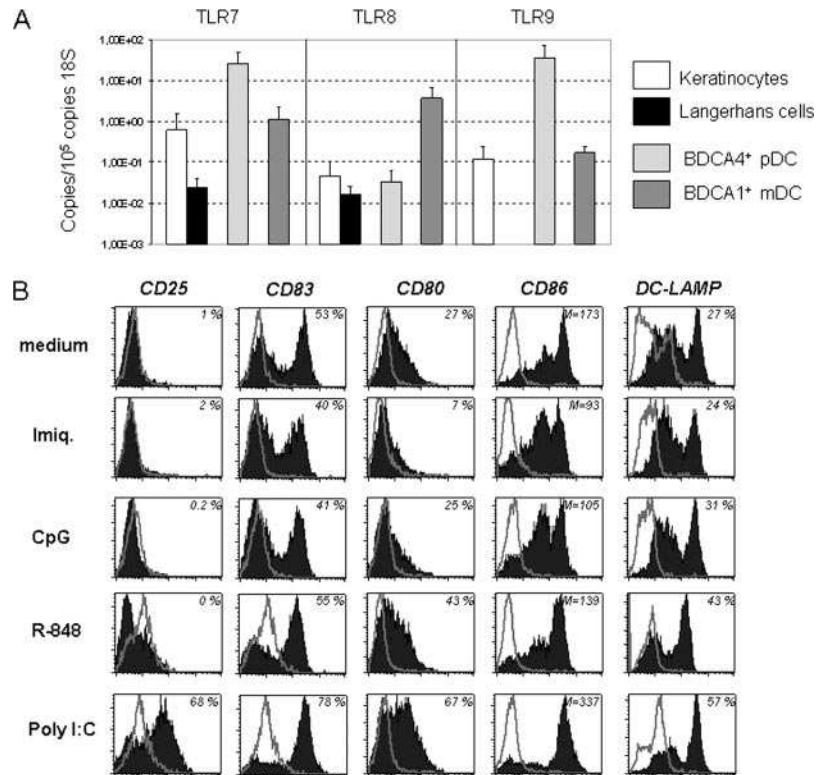


FIGURE 4. Human LC express TLR3 and mature in the presence of poly(I:C). *A*, Real-time quantitative PCR for TLR3 was performed on cDNA obtained from keratinocytes, MACS-purified CD1a⁺ LC, BDCA-4⁺ blood pDC, and BDCA-1⁺ blood mDC. Results were expressed as copy numbers for 10⁵ copies of 18S rRNA. *B*, Fresh, gradient-purified LC were stained with anti-CD1a or were permeabilized and stained with anti-human TLR3 (filled histograms). Open histograms represent isotype-matched negative control Abs. *C*, Gradient-purified LC were cultured in medium alone or with 25 μg/ml poly(I:C). Twenty-four hours later, cells were harvested and stained with anti-CD25, -CD83, -CD80, -CD86, or -DC-LAMP mAbs (filled histograms) or isotype-matched negative control Abs (open histograms). Percentages of positive cells or mean fluorescence intensity (M) are shown in the *upper right corner* of the histograms. Results are representative of at least five independent experiments.

FIGURE 5. Human LC are devoid of TLR7, TLR8, and TLR9. *A*, Real-time quantitative PCR for TLR7, TLR8, and TLR9 were performed on cDNA obtained from keratinocytes, MACS-purified CD1a⁺ LC, BDCA-4⁺ blood pDC, and BDCA-1⁺ blood mDC. Results were expressed as copy numbers for 10⁵ copies of 18S rRNA. *B*, Gradient-purified LC were cultured in medium alone or with 25 μ M imiquimod (Imiq.), 10 μ M R-848, 10 μ g/ml CpG ODN 2216 (CpG), or 25 μ g/ml poly(I:C). Twenty-four hours later, cells were harvested and stained as indicated with anti-CD25, -CD83, -CD80, -CD86, or -DC-LAMP mAbs (filled histograms) or isotype-matched negative control Abs (open histograms). Percentages of positive cells or mean fluorescence intensity (M) are shown in the *upper right corner* of the histograms. Results are representative of at least five independent experiments.



LC produce cytokines following activation through TLR2 and TLR3. PAMP-driven maturation of DC is usually concomitant with the production of cytokines and chemokines (1, 2). Therefore, we examined the production of soluble factors induced by TLR ligands in gradient-purified LC to address possible differences in their respective activation capacity.

LC released substantial amounts of IL-6 when stimulated with PGN, LTA, and, even more potently, poly(I:C) (Fig. 6A). A modest secretion of IL-6 was detected following treatment of gradient-purified LC with LPS and imiquimod. As LC do not undergo noticeable maturation in response to these ligands, this low IL-6 production might be attributable to the few contaminating keratinocytes, which

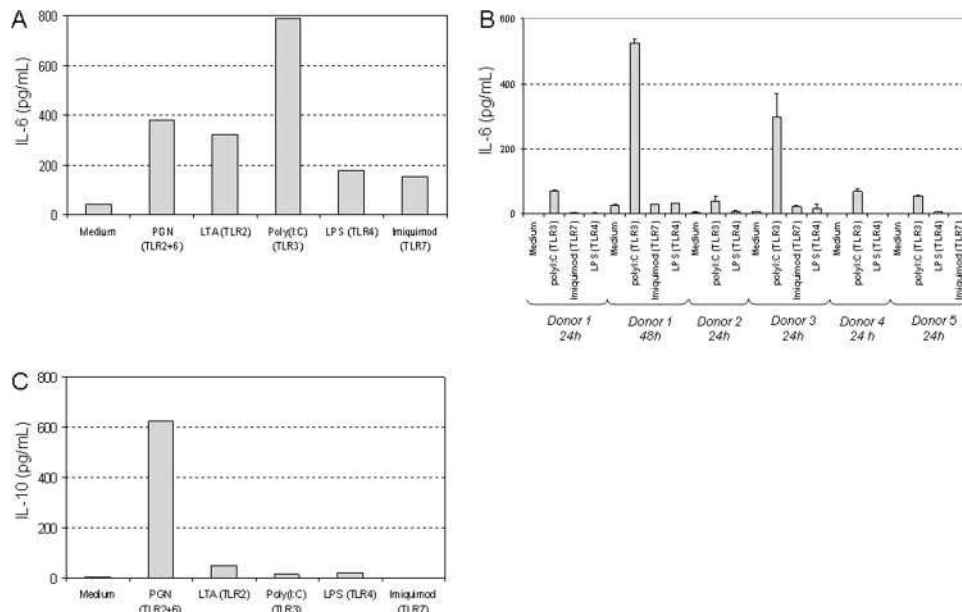
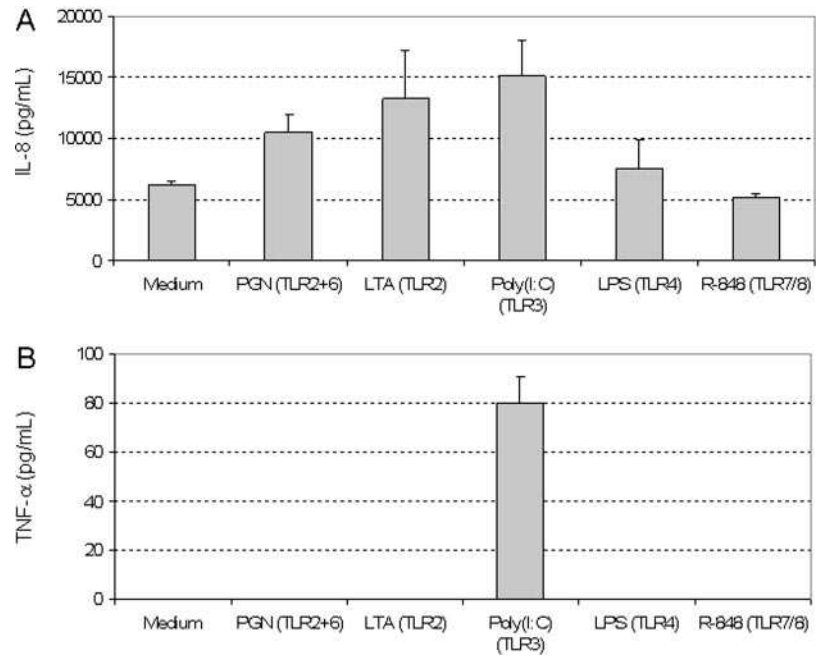


FIGURE 6. Production of IL-6 and IL-10 by human LC activated by TLR agonists. *A* and *C*, Gradient-purified LC were cultured in medium alone or with 10 μ g/ml PGN, 10 μ g/ml LTA, 25 μ g/ml poly(I:C), 1 μ g/ml LPS, or 25 μ M imiquimod. Twenty-four hours later, supernatants were harvested and cytokine production was quantified by CBA assay (*A*, IL-6; *C*, IL-10). Note that, due to low numbers of LC yielded, CBA experiments were not duplicated within each skin sample, but results are representative of at least four independent experiments. *B*, Production of IL-6 by MACS-purified LC activated by TLR agonists was also analyzed on five independent donors. CD1a⁺ LC were cultured in medium alone or with 25 μ g/ml poly(I:C), 1 μ g/ml LPS, or 25 μ M imiquimod. Twenty-four or 48 hours later, supernatants were harvested and IL-6 production was quantified by ELISA.

FIGURE 7. Production of IL-8 and TNF- α by human LC activated by TLR agonists. MACS-purified CD1a⁺ LC were cultured in medium alone or with 10 μ g/ml PGN, 10 μ g/ml LTA, 25 μ g/ml poly(I:C), 1 μ g/ml LPS, or 10 μ M R-848. Twenty-four hours later, supernatants were harvested and cytokine production was quantified by ELISA (A, IL-8; B, TNF- α). Results are representative of three independent experiments.



express high levels of TLR4 and TLR7. Indeed, no more IL-6 production could be observed in response to LPS and imiquimod when using MACS-purified LC (Fig. 6B). Treatment with poly(I:C), LPS, or imiquimod did not stimulate IL-10 production (Fig. 6C). Interestingly, production of IL-10 was induced by PGN, but not LTA, although recognition of both compounds relies on TLR2.

IL-8 and TNF- α can be secreted by LC, but they are also strongly induced in activated keratinocytes (18–22, 31, 33, 35). We showed that both keratinocytes and LC express TLR2 and TLR3 and might therefore secrete cytokines in response to the same agonists. Thus, evaluation of IL-8 and TNF- α secretion was performed on LC enriched by CD1a MACS rather than gradient purification. MACS-purified LC produced high constitutive levels of IL-8 when cultured in medium alone (Fig. 7A), which is most likely related to their spontaneous maturation. Yet, a notable increase in IL-8 could be induced upon PGN, LTA, or poly(I:C) exposure. We also noticed that only poly(I:C) stimulated production of TNF- α (Fig. 7B).

In addition, neither CD40 triggering nor TLR agonists were able to drive production of IL-1 β and, most interestingly, bioactive IL-12p70 (data not shown). Finally, as type I IFNs are of critical importance in the context of viral infections, we evaluated the production of IFN- α and IFN- β by LC exposed to poly(I:C) (Table II). However, we were unable to detect significant concentrations of these mediators in the supernatants of activated LC.

Table II. Production of type I IFN by human LC activated by poly(I:C)^a

	IFN- α (pg/ml)	IFN- β (pg/ml)
Langerhans cells ($n = 4$)		
Medium	<31, 25	<50
Poly(I:C)	<31, 25	<50
Blood pDC ($n = 3$)		
IL-3	<31, 25	ND
Influenza virus	26,219.4 \pm 9,830.4	ND

^a Gradient-purified LC were cultured in medium alone or with 25 μ g/ml poly(I:C). Purified blood pDC were cultured with IL-3 (20 ng/ml) or formaldehyde-inactivated influenza virus (1 HAU/ml). Twenty-four hours later, supernatants were harvested and quantified for IFN- α and IFN- β production by ELISA. n represents the number of independent donors tested.

Discussion

To date, pathogen-derived molecules that directly drive maturation of human LC through activation of TLR are insufficiently characterized (25). Our systematic PCR analysis of LC freshly isolated from human skin reveals expression of TLR1, TLR2, TLR3, TLR6, and TLR10, as well as low levels of TLR5 mRNA (data not shown). In parallel, human suprabasal keratinocytes display TLR1–5, TLR7, and TLR10 mRNA. These TLR expression patterns, extended by LC activation assays performed with defined TLR agonists, shed light on the role of LC and keratinocytes in human skin exposed to potentially pathogenic microorganisms.

Gram-positive bacteria represent the majority of commensal microorganisms that colonize the skin of healthy individuals, but also the bulk of virulent species developing on wounded skin and causing severe skin infections (36). PGN and LTA, which are characteristic PAMP shared by all Gram-positive bacteria, trigger maturation of fresh human LC and enhance IL-6 and IL-8 release. Interestingly, PGN is the only TLR agonist inducing IL-10 production. This differential effect might be explained by the fact that, while both PGN and LTA engage TLR2, activation by PGN requires cooperation of TLR6 (9, 10), which is highly expressed in LC. In line with our results, a strong IL-10 production was found to be a hallmark of human DC stimulated with PGN (37). IL-10 inhibits APC function and migration of LC, most likely because it modulates proinflammatory cytokines secretions that enhance LC maturation (37–39). For this reason, we hypothesize that IL-10 could be required to avoid immune responses to commensal bacteria. Discrimination between unharmed and pathogenic Gram-positive bacteria may result from the level of PGN detection. Indeed, PGN from commensal bacteria is only available to extracellular TLR2 and TLR6 (10, 23), similar to our in vitro assays. In contrast, virulent *S. aureus* have an invasive phenotype and release PGN intracellularly, where it could engage the cytoplasmic NOD receptors, present in other DC subsets (40). Alternatively, IL-10 may keep immune responses under control, thereby preventing organ injuries. Indeed, while murine DC activated by *S. aureus* PGN produce high amounts of IL-10 (41),

resistance of TLR2^{-/-} mice to *S. aureus* infections is severely impaired (42).

Human skin may also be exposed to Gram-negative bacteria, although they are not resident and are rarely responsible for infections (36). Murine LC migrate following skin exposure to LPS and have been suggested to express TLR4 (43, 44), but in vitro activation assays show poor correlation with these findings (43). Accordingly, and in line with earlier observations (23, 25), no TLR4 transcripts are present in human LC, and only negligible maturation is achieved upon treatment with high doses of LPS in vitro.

To determine a role of human LC in the detection of viruses, we investigated TLR3, TLR7/8, and TLR9, which are receptors for viral nucleic acids, and have been frequently highlighted for their capacity of inducing production of type I IFNs, a critical set of cytokines with direct effects on viral replication. We did not study expression of the cytoplasmic dsRNA receptors retinoic acid-inducing gene-I and protein kinase R, whose expression pattern in the skin is unknown so far (4). Freshly purified human LC displayed TLR3 mRNA, similar to murine LC (43, 45), as well as intracellular TLR3 protein. Consequently, poly(I:C) very strongly matured gradient-purified LC and augmented IL-6 secretion more potently than other TLR agonists. This is probably due to the unique ability of dsRNA to induce TNF- α , which likely amplifies LC response. Nevertheless, poly(I:C)-stimulated LC do not release type I IFNs. Hence, in contrast to pDC which produce high amounts of type I IFNs, human LC do not act as innate effector cells in viral infections.

Epicutaneous application of imiquimod, a specific agonist of TLR7, induces emigration of LC (46, 47) and strong immune responses, which have been proven efficient for the treatment of viral infection and cancers (48). Yet, we provide the first report of the absence of TLR7 and TLR8 in freshly isolated human LC, in line with lack of TLR7 in murine LC (43). Our findings explain and extend previous observations showing that human LC do not mature after exposure to imiquimod and R-848 in vitro (49). Regarding TLR9, mRNA has been described in purified murine LC (43), and CpG ODN trigger migration and activation of these cells in vivo (50, 51). However, activation of purified murine LC by CpG ODN could not be achieved in vitro (43). Likewise, freshly isolated human LC show no direct response to CpG ODN, consistent with their lack of TLR9, and keratinocytes do not express TLR9 either. Thus, we propose that, in vivo, deep penetration of imiquimod cream into the dermis and s.c. injections of CpG ODN activates nonepidermal cells, such as dermal DC, macrophages, and fibroblasts, the migration of LC being secondary to a release of proinflammatory cytokines. However, this hypothesis remains to be specifically evaluated.

Thus, the detection of pathogen invasion through LPS and ssRNA is not a primary function of LC, thereby suggesting a role for keratinocytes in the recognition of these PAMP. Earlier publications describing TLR in keratinocytes mainly relied on undifferentiated basal epidermal cells, isolated from foreskin, and differentiated after long periods of in vitro culture, which resulted in discrepancies (18–22). Here, we definitively state that suprabasal keratinocytes directly isolated from human skin notably display TLR4 and TLR7. Although other investigators could not detect the latter (22, 35), in vitro-cultured keratinocytes stimulated by TLR4 or TLR7 ligands increase transcription and release of proinflammatory mediators (22, 31, 33, 35). In line with this, LPS and imiquimod triggered IL-6 release only in keratinocyte-contaminated preparations of gradient-enriched LC. Yet, isolated suprabasal keratinocytes did not produce TNF- α when exposed to TLR agonists, presumably because their advanced state of differentiation precludes full activation in vitro (data not shown). Still, keratinocyte-

induced inflammation in vivo probably results in maturation and migration of LC, as well as attraction of other immune cells (52, 53). Keratinocytes could therefore substitute to LC for the primary detection of LPS and ssRNA, and also, because they express high levels of TLR3, enhance dsRNA-induced LC maturation.

In summary, freshly purified human LC express a restricted set of functional TLR, namely TLR2, TLR6, and TLR3, and are directly activated by their respective ligands, while cooperation of keratinocytes and other cell types is probably essential for response to Gram-negative bacteria and viruses in vivo. In particular, lack of type I IFN production precludes a direct effector role of LC in viral infections and further argues that the full development of an immune response in the skin does not solely rely on these cells. Of interest, activation of LC by different TLR agonists leads to specific cytokine secretion profiles. Although the exact physiological relevance of PGN-specific IL-10 secretion remains to be determined, LC may contribute to the tolerance of commensal Gram-positive bacteria that colonize the skin of healthy individuals without causing inflammation. As no bioactive IL-12p70 was observed following TLR engagement alone, the release of this key Th1-polarizing cytokine may require additional signals provided by PAMP combinations or engagement of CD40 by T cells, as previously suggested for LC and other DC subsets (25, 54, 55). In this context, it will be of critical importance to decipher the functional influence of differential PAMP-driven activation of LC on the tuning of skin immune responses and particularly on T cell responses.

Acknowledgments

We thank Dr. E. Weill and his clinical staff in Lyon, who provided us with skin samples. We also thank Prof. A. Claudy, Dr. N. Bendriss-Vermare, and Dr. N. Romani for their helpful comments.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 767–811.
- Iwasaki, A., and R. Medzhitov. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 5: 987–995.
- O'Neill, L. A. 2004. TLRs: Professor Mechnikov, sit on your hat. *Trends Immunol.* 25: 687–693.
- Kawai, T., and S. Akira. 2006. Innate immune recognition of viral infection. *Nat. Immunol.* 7: 131–137.
- Akira, S., and K. Takeda. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 499–511.
- Underhill, D. M., A. Ozinsky, K. D. Smith, and A. Aderem. 1999. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 14459–14463.
- Schwandner, R., R. Dziarski, H. Wesche, M. Rothe, and C. J. Kirschning. 1999. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2. *J. Biol. Chem.* 274: 17406–17409.
- 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.
- Ozinsky, A., D. M. Underhill, J. D. Fontenot, A. M. Hajjar, K. D. Smith, C. B. Wilson, L. Schroeder, and A. Aderem. 2000. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 13766–13771.
- Nakao, Y., K. Funami, S. Kikkawa, M. Taniguchi, M. Nishiguchi, Y. Fukumori, T. Seya, and M. Matsumoto. 2005. Surface-expressed TLR6 participates in the recognition of diacylated lipopeptide and peptidoglycan in human cells. *J. Immunol.* 174: 1566–1573.
- Hasan, U., C. Chaffois, C. Gaillard, V. Saulnier, E. Merck, S. Tancredi, C. Guet, F. Briere, J. Vlach, S. Lebecque, et al. 2005. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J. Immunol.* 174: 2942–2950.
- Qureshi, S. T., L. Lariviere, G. Leveque, S. Clermont, K. J. Moore, P. Gros, and D. Malo. 1999. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (TLR4). *J. Exp. Med.* 189: 615–625.
- 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.
14. Jarrossay, D., G. Napolitani, M. Colonna, F. Sallusto, and A. Lanzavecchia. 2001. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 31: 3388–3393.
 15. Kadowaki, N., S. Ho, S. Antonenko, R. W. Malefyt, R. A. Kastelein, F. Bazan, and Y. J. Liu. 2001. Subsets of human dendritic cell precursors express different Toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.* 194: 863–869.
 16. Krug, A., A. Towarowski, S. Britsch, S. Rothenfusser, V. Hornung, R. Bals, T. Giese, H. Engelmann, S. Endres, A. M. Krieg, and G. Hartmann. 2001. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur. J. Immunol.* 31: 3026–3037.
 17. Ito, T., R. Amakawa, T. Kaisho, H. Hemmi, K. Tajima, K. Uehira, Y. Ozaki, H. Tomizawa, S. Akira, and S. Fukuhara. 2002. Interferon- α and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J. Exp. Med.* 195: 1507–1512.
 18. Kawai, K., H. Shimura, M. Minagawa, A. Ito, K. Tomiyama, and M. Ito. 2002. Expression of functional Toll-like receptor 2 on human epidermal keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 30: 185–194.
 19. Song, P. I., Y. M. Park, T. Abraham, B. Harten, A. Zivony, N. Neparidze, C. A. Armstrong, and J. C. Ansel. 2002. Human keratinocytes express functional CD14 and Toll-like receptor 4. *J. Invest. Dermatol.* 119: 424–432.
 20. Mempel, M., V. Voelcker, G. Kollisch, C. Plank, R. Rad, M. Gerhard, C. Schnopp, P. Fraunberger, A. K. Walli, J. Ring, et al. 2003. Toll-like receptor expression in human keratinocytes: nuclear factor κ B controlled gene activation by *Staphylococcus aureus* is Toll-like receptor 2 but not Toll-like receptor 4 or platelet activating factor receptor dependent. *J. Invest. Dermatol.* 121: 1389–1396.
 21. Pivarsci, A., L. Bodai, B. Rethi, A. Kenderessy-Szabo, A. Koreck, M. Szell, Z. Beer, Z. Bata-Csorgo, M. Magocsi, E. Rajnavolgyi, et al. 2003. Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int. Immunol.* 15: 721–730.
 22. Kollisch, G., B. N. Kalali, V. Voelcker, R. Wallich, H. Behrendt, J. Ring, S. Bauer, T. Jakob, M. Mempel, and M. Ollert. 2005. Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes. *Immunology* 114: 531–541.
 23. Takeuchi, J., E. Watari, E. Shinya, Y. Norose, M. Matsumoto, T. Seya, M. Sugita, S. Kawana, and H. Takahashi. 2003. Down-regulation of Toll-like receptor expression in monocyte-derived Langerhans cell-like cells: implications of low-responsiveness to bacterial components in the epidermal Langerhans cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306: 674–679.
 24. Tchou, I., O. Sabido, C. Lambert, L. Misery, O. Garraud, and C. Genin. 2003. Technique for obtaining highly enriched, quiescent immature Langerhans cells suitable for ex vivo assays. *Immunol. Lett.* 86: 7–14.
 25. Peiser, M., R. Wanner, and G. Kolde. 2004. Human epidermal Langerhans cells differ from monocyte-derived Langerhans cells in CD80 expression and in secretion of IL-12 after CD40 cross-linking. *J. Leukocyte Biol.* 76: 616–622.
 26. van Kooten, C., C. Gaillard, J. P. Galizzi, P. Hermann, F. Fossiez, J. Bancheureau, and D. Blanchard. 1994. B cells regulate expression of CD40 ligand on activated T cells by lowering the mRNA level and through the release of soluble CD40. *Eur. J. Immunol.* 24: 787–792.
 27. Termeer, C., J. P. Sleeman, and J. C. Simon. 2003. Hyaluronan—magic glue for the regulation of the immune response? *Trends Immunol.* 24: 112–114.
 28. Zhong, F., W. Cao, E. Chan, P. N. Tay, F. F. Cahya, H. Zhang, and J. Lu. 2005. Deviation from major codons in the Toll-like receptor genes is associated with low Toll-like receptor expression. *Immunology* 114: 83–93.
 29. Baker, B. S., J. M. Ovigne, A. V. Powles, S. Corcoran, and L. Fry. 2003. Normal keratinocytes express Toll-like receptors (TLRs) 1, 2 and 5: modulation of TLR expression in chronic plaque psoriasis. *Br. J. Dermatol.* 148: 670–679.
 30. Curry, J. L., J. Z. Qin, B. Bonish, R. Carrick, P. Bacon, J. Panella, J. Robinson, and B. J. Nickoloff. 2003. Innate immune-related receptors in normal and psoriatic skin. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 127: 178–186.
 31. Kock, A., T. Schwarz, R. Kirnbauer, A. Urbanski, P. Perry, J. C. Ansel, and T. A. Luger. 1990. Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor α : evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *J. Exp. Med.* 172: 1609–1614.
 32. Wagner, H. 2004. The immunobiology of the TLR9 subfamily. *Trends Immunol.* 25: 381–386.
 33. Kono, T., S. Kondo, S. Pastore, G. M. Shivji, M. A. Tomai, R. C. McKenzie, and D. N. Sauder. 1994. Effects of a novel topical immunomodulator, imiquimod, on keratinocyte cytokine gene expression. *Lymphokine Cytokine Res.* 13: 71–76.
 34. Gorden, K. B., K. S. Gorski, S. J. Gibson, R. M. Kedl, W. C. Kieper, X. Qiu, M. A. Tomai, S. S. Alkan, and J. P. Vasilakos. 2005. Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *J. Immunol.* 174: 1259–1268.
 35. Fujisawa, H., G. M. Shivji, S. Kondo, B. Wang, M. A. Tomai, R. L. Miller, and D. N. Sauder. 1996. Effect of a novel topical immunomodulator, S-28463, on keratinocyte cytokine gene expression and production. *J. Interferon Cytokine Res.* 16: 555–559.
 36. Chiller, K., B. A. Selkin, and G. J. Murakawa. 2001. Skin microflora and bacterial infections of the skin. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 6: 170–174.
 37. Re, F., and J. L. Strominger. 2004. IL-10 released by concomitant TLR2 stimulation blocks the induction of a subset of Th1 cytokines that are specifically induced by TLR4 or TLR3 in human dendritic cells. *J. Immunol.* 173: 7548–7555.
 38. Enk, A. H., V. L. Angeloni, M. C. Udey, and S. I. Katz. 1993. Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10: a role for IL-10 in induction of tolerance. *J. Immunol.* 151: 2390–2398.
 39. Wang, B., L. Zhuang, H. Fujisawa, G. A. Shinder, C. Feliciani, G. M. Shivji, H. Suzuki, P. Amerio, P. Toto, and D. N. Sauder. 1999. Enhanced epidermal Langerhans cell migration in IL-10 knockout mice. *J. Immunol.* 162: 277–283.
 40. 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.
 41. Qi, H., T. L. Denning, and L. Soong. 2003. Differential induction of interleukin-10 and interleukin-12 in dendritic cells by microbial Toll-like receptor activators and skewing of T-cell cytokine profiles. *Infect. Immun.* 71: 3337–3342.
 42. 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.
 43. Mitsui, H., T. Watanabe, H. Saeki, K. Mori, H. Fujita, Y. Tada, A. Asahina, K. Nakamura, and K. Tamaki. 2004. Differential expression and function of Toll-like receptors in Langerhans cells: comparison with splenic dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* 122: 95–102.
 44. Roake, J. A., A. S. Rao, P. J. Morris, C. P. Larsen, D. F. Hankins, and J. M. Austyn. 1995. Dendritic cell loss from nonlymphoid tissues after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and interleukin 1. *J. Exp. Med.* 181: 2237–2247.
 45. Fujita, H., A. Asahina, H. Mitsui, and K. Tamaki. 2004. Langerhans cells exhibit low responsiveness to double-stranded RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319: 832–839.
 46. Suzuki, H., B. Wang, G. M. Shivji, P. Toto, P. Amerio, M. A. Tomai, R. L. Miller, and D. N. Sauder. 2000. Imiquimod, a topical immune response modifier, induces migration of Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.* 114: 135–141.
 47. Michalopoulos, P., N. Yawalkar, M. Bronnimann, A. Kappeler, and L. R. Braathen. 2004. Characterization of the cellular infiltrate during successful topical treatment of lentigo maligna with imiquimod. *Br. J. Dermatol.* 151: 903–906.
 48. Dockrell, D. H., and G. R. Kinghorn. 2001. Imiquimod and resiquimod as novel immunomodulators. *J. Antimicrob. Chemother.* 48: 751–755.
 49. Burns, R. P., Jr., B. Ferbel, M. Tomai, R. Miller, and A. A. Gaspari. 2000. The imidazoquinolines, imiquimod and R-848, induce functional, but not phenotypic, maturation of human epidermal Langerhans' cells. *Clin. Immunol.* 94: 13–23.
 50. Ban, E., L. Dupre, E. Hermann, W. Rohn, C. Vendeville, B. Quatannens, P. Ricciardi-Castagnoli, A. Capron, and G. Riveau. 2000. CpG motifs induce Langerhans cell migration in vivo. *Int. Immunol.* 12: 737–745.
 51. Jakob, T., P. S. Walker, A. M. Krieg, M. C. Udey, and J. C. Vogel. 1998. Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J. Immunol.* 161: 3042–3049.
 52. Lebre, M. C., J. C. Antons, P. Kalinski, J. H. Schuitemaker, T. M. van Capel, M. L. Kapsenberg, and E. C. De Jong. 2003. Double-stranded RNA-exposed human keratinocytes promote Th1 responses by inducing a type-1 polarized phenotype in dendritic cells: role of keratinocyte-derived tumor necrosis factor α , type I interferons, and interleukin-18. *J. Invest. Dermatol.* 120: 990–997.
 53. Berthier-Vergnes, O., F. Bermond, V. Flacher, C. Massacrier, D. Schmitt, and J. Peguet-Navarro. 2005. TNF- α enhances phenotypic and functional maturation of human epidermal Langerhans cells and induces IL-12 p40 and IP-10/CXCL-10 production. *FEBS Lett.* 579: 3660–3668.
 54. Napolitani, G., A. Rinaldi, F. Bertoni, F. Sallusto, and A. Lanzavecchia. 2005. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat. Immunol.* 6: 749–750.
 55. Schulz, O., A. D. Edwards, M. Schito, J. Aliberti, S. Manickasingham, A. Sher, and C. Reis e Sousa. 2000. CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. *Immunity* 13:453–462.

B. Article 2 : Expression and function of innate receptors by freshly isolated human dermal dendritic cells

Bouschbacher Marielle, Gofflo Sandrine, Verronèse Estelle, Flacher Vincent, Lebecque Serge, Caux Christophe, Dezutter-Dambuyant Colette et Valladeau Jenny

En préparation

Les cellules dendritiques dermiques (DDC) ont été très peu étudiées. Depuis les premières études qui ont décrit leur présence au sein du derme humain par identifications immuno-histochimiques, plusieurs travaux ont caractérisé les DDC en utilisant différentes techniques de purification. Ainsi, il a été démontré, par des expériences d'activation lymphocytaire *in vitro*, qu'elles pourraient être impliquées dans la mise en place de la réponse immunitaire chez l'homme. Néanmoins, les études réalisées ces dernières années chez la souris ont démontré qu'elles joueraient un rôle différent dans l'immunité cutanée de celui des CL, en particulier dans les réactions d'hypersensibilité de contact et dans les réponses anti-virales.

La reconnaissance des signaux de danger par les cellules du système immunitaire est médiée par divers *Pattern Recognition Receptors* (PRR). Parmi ces PRR, les récepteurs TLR, les lectines de type C ou les récepteurs *scavengers* (SR) reconnaissent une très grande diversité de molécules présentes à la surface des micro-organismes ou des composés endogènes. Les DC immatures des tissus périphériques capturent notamment les antigènes *via* leurs PRR. Elles migrent alors vers les ganglions lymphatiques où elles activent les lymphocytes T et induisent une réponse immunitaire spécifique.

L'objectif de ce travail a été de compléter la caractérisation des DDC humaines, en se focalisant plus particulièrement sur les récepteurs de l'immunité innée. Nous avons ainsi démontré que les DDC fraîchement isolées de derme humain expriment les lectines de type C MMR, DC-SIGN et Dectin-1. Par ailleurs, elles expriment également les ARNm de certains SR. De manière intéressante, nous avons établi que, contrairement aux macrophages, elles n'expriment pas MARCO, SR impliqué dans la reconnaissance de bactéries Gram⁺ et Gram⁻.

MARCO pourrait alors être considéré comme un marqueur spécifique des macrophages dermiques humains. Enfin, nous avons détaillé pour la première fois, l'expression des TLR par les DDC humaines. Contrairement aux CL, elles expriment tous les TLR exceptés TLR5, 7, 9 et 10. De manière intéressante, les DDC expriment plus particulièrement TLR4, qui n'est pas exprimé par les CL. Elles répondent à l'activation par Poly(IC) en sécrétant de l'IL-6 et du TNF- α , l'activation par PGN induit au contraire une sécrétion forte d'IL-10.

**EXPRESSION AND FUNCTION OF INNATE RECEPTORS BY
FRESHLY ISOLATED HUMAN DERMAL DENDRITIC CELLS**

M. Bouschbacher¹, S. Gofflo¹, E. Verronèse¹, V. Flacher², S. Lebecque³, C. Caux⁴, C. Dezutter-Dambuyant¹ and J. Valladeau¹

¹ Université Claude Bernard Lyon 1, EA3732, Centre Hospitalier Edouard Herriot, Lyon, France

² Department of dermatology, Innsbruck Medical University, Innsbruck, Austria

³ Service de Pneumologie, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Pierre-Bénite, France

⁴ Centre Léon Bérard, Lyon, France

Running title: Fresh dermal DC

Key words: Dermal dendritic cells/ TLR/ C-type Lectins/ Scavenger receptor

ABSTRACT

Residing in the epidermis, Langerhans cells (LC) play a critical role in initiating skin immune responses. Nevertheless, dermal DC (DDC), still barely studied, also contribute to the maintenance of cutaneous immunity by uptaking pathogens, rapidly migrating to lymph node and activating naive T lymphocytes. The purpose of our work was to complete the previous characterization of DDC by studying the expression and function of the innate receptors C-type lectins, Toll-Like Receptor (TLR) and scavenger receptor, using freshly isolated human DDC. By focusing on the HLA-DR^{high} DDC CD1c⁺ population, we found that DDC presented typical DC morphology and expressed DC markers such as DC-SIGN, MMR and Dectin-1. Furthermore, they expressed mRNA of scavenger receptor SRA, LOX-1, SR-PSOX/ CXCL16 and CLA-1. Interestingly, as mRNA of MARCO was only expressed by macrophages, MARCO should be used as another specific human macrophage marker. Using real-time PCR, we complete the characterisation of the profile of their innate receptors by demonstrating that HLA-DR⁺ dermal cells expressed TLR1, 2, 4 and 6 and TLR3 and TLR8. To further attest the expression of functional receptors, we analysed the secretion of IL-6, IL-10 and TNF- α upon activation with TLR ligands. Finally, DDC ability to uptake FITC-Dextran and acetyl-low density lipoproteins was evaluated. In conclusion, we provided here, by identifying the profile of innate receptors of DDC, a better characterisation of human DDC that will be helpful to understand their function in cutaneous immunity.

INTRODUCTION

Dendritic cells are sentinels distributed all around the organism. They sense danger signals like pathogen associated compounds and then direct the immune responses. After antigens capture, DC migrate to different sites and activate lymphocytes to promote either immunity or tolerance (Steinman, 2003). Langerhans cells (LC) have always been the prototype DC of the skin. Residing in the epidermis, they play a critical role in initiating skin immune responses. Dermal DC are still barely studied, although some previous studies have shown, by using different isolation techniques, that they contribute, as well as LC, to the maintenance of cutaneous immunity (Angel et al., 2006; Furio et al., 2005; Lenz et al., 1993; Nestle et al., 1993; Sepulveda-Merrill et al., 1994). Nevertheless, studies realized in mice suggested that DDC may play different role than LC in skin immunity (Kaplan et al., 2005; Kissenpfennig et al., 2005b; Allan et al., 2003; Zhao et al., 2003).

How danger signal are sensed by DDC is of importance as it will be the first and critical step in initiating the immune response. DC expressed several classes of innate receptors, including Toll-Like Receptors (TLR), C-Type Lectins Receptors (CLR) and Scavenger Receptors (SR). These Pattern Recognition Receptors (PRR) can recognize Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMP) displayed at the cell surface of microorganisms. CLR, such as DC-SIGN or Langerin bind sugars in a calcium-dependent manner using highly conserved carbohydrate recognition domain. TLR represent a family of type I transmembrane proteins. Until now, 10 human TLRs have been described. They recognize bacterial (TLR1, 2, 4, 5 and 6), and viral components (TLR3, 7, 8 and 9) and directly activate signalling pathways in DC and other cell types. In human, differences exist in TLR expression from one DC subset to another. In blood, myeloid DC (mDC) express TLR1-6, TLR8 and TLR10, whereas plasmacytoid DC (pDC) display TLR1, TLR6, TLR10 and high level of TLR7 and TLR9 (Jarrossay et al., 2001; Kadowaki et al., 2001). Finally, SR are cell

surface glycoproteins which were first described on macrophages by their ability to bind chemically acetylated or oxidized Low Density Lipoprotein (Ac or Ox-LDL) (Kodama et al., 1990). Recent studies demonstrated that SR expression on other cell types such as DC have an important role in antigen uptake and presentation (Mukhopadhyay and Gordon, 2004). Thus, considering these new PRR, it appears of interest to search for their expression on different DC subpopulations, and especially on DDC whose primary function may be to capture antigens.

In this paper, we performed studies on dermal dendritic cells freshly purified from human dermis. Focusing on the expression on PRR by these human DDC, we identified the expression of CLR, TLR and SR, specialized in the recognition of bacteria and viruses. Nowadays, vaccination is under intensive investigation. Thus, a better understanding of DDC and their role in immune responses would allow clinicians to improve direct exploitation of DDC in vaccination strategies.

MATERIAL AND METHODS

Media, cytokines and reagents

Cells were cultured in RPMI-1640 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS; Invitrogen, Carlsbad, CA), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin (Gibco BRL) and 100 µg/ml streptomycin (Gibco BRL) (hereafter referred to as complete medium). rhGM-CSF (Schering-Plough Research Institute, Kenilworth, NJ) was used at a saturating concentration of 100 ng/ml (200 U/ml), rhSCF (25 ng/ml), rhTNF- α (2.5 ng/ml), IL-4 (10 ng/ml) are all from R&D Systems (R&D Systems, Boston, MA).

Staphylococcus aureus peptidoglycan (PGN) (Fluka, Heidelberg, Germany) was used at 10 µg/mL. Poly(I:C) (Invivogen, San Diego, CA) was used at 10 µg/ml, R-848 used at 10 µM was synthesised at the Schering-Plough Research Institute. Zymozan was used at 100 µg/ml (Molecular Probes, Invitrogen).

Isolation of dermal dendritic cells and blood dendritic cells

Skin was obtained according to institutional guidelines and after patients' consent. Skin was split-cut with a keratome set and the skin explants were incubated in 0,4 mg/ml of dispase II (Roche, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN) in Hank's balanced salt solution (HBSS; Gibco BRL) overnight at 4°C. The dermis was detached from the epidermis with fine forceps. Dermal sheets were then cut into small sections and incubated with 1 mg/ml collagenase (Sigma-Aldrich) for 2 hours at 37°C. Cells were manually disrupted with a pipette, filtered through sterile mesh nylon gauzes and through a 70µm filter to separate the non digested tissue from the cell suspension (Tse and Cooper, 1990). Cells were purified using Macs Isolation kit with anti-HLA-DR or anti-CD1c antibodies (Miltenyi Biotec GmbH, Bergish Gladbach, Germany) using LS separation columns and according to the manufacturers' instructions. Blood samples of healthy donors were obtained according to institutional guidelines. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by Ficoll-Hypaque centrifugation (Eurobio, Paris, France). The CD19⁺ B cells and CD14⁺ monocytes were removed from the sample by CD19 and CD14 MACS purification using MiniMACS separation columns (Miltenyi Biotec). The remaining cells were further enriched in MiniMACS columns using microbeads coated with anti-BDCA-1 or anti-BDCA-4 mAbs, thereby selecting BDCA-1⁺ mDC and BDCA-4⁺ pDC. Reanalysis of the sorted populations showed a purity higher than 98%.

***In vitro* generation of dendritic cells and macrophages**

Monocytes were purified by immunomagnetic depletion (Monocytes Isolation Kit II, Miltenyi Biotech) after preparation of PBMC. Monocyte-derived DC (MoDC) were produced during 6 days in the presence of GM-CSF and IL-4 (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). CD34⁺ haematopoietic cells were purified from cord blood by magnetic isolation (Indirect CD34 MicroBead Kit, Miltenyi Biotech). CD34⁺ cells were cultured during 6 days in 200 ng/ml GM-CSF, 25 ng/ml SCF and 2,5 ng/ml TNF- α . Then, after 6 days cultured in medium supplemented with 200 ng/ml GM-CSF and 10 ng/ml IL4, CD34-derived dendritic cells were obtained. Monocyte-derived macrophages were produced during 6 days in IL-2 (50 U/ml) and 5% normal human AB serum.

Antibodies and Flow cytometry

Cells were incubated 15 minutes at 4°C with affinity purified mAbs at the appropriate concentration or with the irrelevant isotype-matched mouse Igs. Anti-HLA-DR-PE or FITC (B8.12.2) and anti-CD11b-FITC (BEAR1) are from Immunotech (Marseille, France). Anti-DC-SIGN-PE (120507) is from R&D Systems (Minneapolis, MN). Anti-MMR-PE (19.2) and anti-CD45-FITC and PE (HI30) are from BD Biosciences (San Jose, CA). Anti-CD1c-PE (AD5-8E7) is from Miltenyi Biotech. Anti-CD146 (24040704) is from Chemicon international (Terneucula, CA) and anti-Dectin-1 (MAB1859) from R&D Systems.

Endocytosis assay

To evaluate uptake ability, 10⁵ cells were incubated in at 37°C with 1 mg/ml FITC-dextran (molecular weight: 70) or 5 μ g/ml Alexa 488-Acetylated-Low Density Lipoprotein (Ac-LDL) both from Molecular Probes (Carlsbad, CA). Uptake was stopped by two washes with ice-

cold 1% FBS-sodium azide PBS. Endocytosis was evaluated by FACS analysis comparing with control samples kept at 4°C.

Immunohistochemistry analysis

Normal human skin were cryofixed and 6- μ m sections were cut. Indirect immunohistochemistry stainings were performed with a streptavidin-biotin-peroxidase assay (LSAB2 Kit, Dako, Glostrup, Denmark). Negative controls were conducted using unrelated isotype-matched mouse immunoglobulins. Counterstaining was carried out with Hematoxylin.

May-Grünwald Staining and Ultrastructural analysis

For transmission electron microscopy, cell pellets were fixed in 2% glutaraldehyde in cacodylate buffer at 4°C for at least 3 days then postfixed for 1 hour with 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer with sucrose. After deshydration, they were embedded in epoxy resin. Ultrathin sections were examined on a JEOL 1200 EX electron microscope at 80kV accelerating voltage (CMEABG, Université de Lyon, Lyon, France). Cells were spun onto glass slides with a Shandon Cytospin 2 during 5 minutes at 500g, air dried, fixed with cold acetone and stained with May-Gründwald Giemsa (Sigma-Aldrich).

RT-PCR and real-time quantitative PCR

Total RNA was extracted from freshly isolated DDC. Total RNA was extracted using RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions and treated with DNase I (Qiagen) for 15 min at room temperature. RT-PCR was performed with Iscript One-Step for Probes kit (Bio-Rad, Hercules, CA). The primers used for PCR amplification are detailed in Table 1. 30 ng of each RNA sample was used. The cycling parameters were as follows: 10 min 50°C/ 5 min 95°C/ 15 sec 95°C, 30 sec 60°C for a total of 35 cycles. PCR

products were separated by electrophoresis on a 1% agarose gel and visualised by ethidium bromide staining. For real-time quantitative PCR, RNA was reverse transcribed using a mix of random hexamer primers (Invitrogen), oligo (dT)₁₅ (Promega), and Superscript II RNase-H reverse transcriptase (Invitrogen). Real-time quantitative PCR was set up in an Icyler IQ (BioRad, Hercules, CA), using Taqman Universal PCR Master Mix, no AmpErase UNG (Applied Biosystems, Foster City, CA), in a final volume of 25 μ L (0.4 μ M of each primer, 0.2 μ M TaqMan probe and 25 ng cDNA). Experiments were performed in triplicates. Primers and probes of TLR and CD4 promoter were designed using Primer 3 software (Whitehead Institute, Cambridge, MA), with a melting temperature of \sim 60°C for primers and \sim 70°C for probes. Sequences and dyes are detailed in Table 2. The absence of genomic DNA contamination was controlled using human CD4 promoter probe. cDNAs were normalized to 18S ribosomal RNA (rRNA) with the Taqman Ribosomal RNA Control Reagents (Applied Biosystems). Real-time data were acquired and analyzed using Icyler IQ Optical System software (Bio-Rad) with automatic adjustment of the baseline and threshold parameters. Gene expression levels were determined using cycle threshold values, directly transferred on the PCR standard curve and transformed into copy numbers. Results are expressed as copy numbers of a specified gene for 10^5 copies of 18S ribosomal RNA.

Cytokine production

Fresh purified DDC (10^6 cells/ml) were cultured for 24 hours with TLR ligands or zymozan at the indicated concentration. IL-6, IL-10 and TNF- α were evaluated using cytometric bead array assays (CBA, BD Biosciences). Following acquisition of sample data by flow cytometry, results were analysed using the BD Biosciences CBA analysis software. Standard curves, plotted using the mean fluorescence intensity of the beads for cytokine values ranging from 0 to 5000 pg/ml were used for quantifying cytokines.

RESULTS

Fresh DDC contained two populations of DC without LC characteristics

To better understand the biological functions of human dermal dendritic cells, we needed to isolate them from human dermis. For this aim, a dermal cell suspension was obtained after epidermis and dermis separation and a subsequent collagenase treatment. The mean number of dermal cells isolated was 58.7 ± 33.3 millions for about 620 ± 160 cm² of skin. Interestingly, based on HLA-DR staining, three populations were detected: a population expressing high level of HLA-DR (R1: $9.1\% \pm 3.3$), another population expressed low level of HLA-DR (R2: $21.7\% \pm 6.3$) and a population HLA-DR negative (Figure 1a). To have a global outline of the dermal suspension, we analysed the expression of different cell type markers. The majority of the dermal population (HLA-DR⁻) was obviously composed of fibroblasts (data not shown). Besides, HLA-DR negative cells co-expressing CD3 represent T lymphocyte population of the dermis (data not shown). As expected, HLA-DR^{high} population co-expressed CD45 (Figure 1b). Focusing on the HLA-DR⁺ population and especially on the HLA-DR^{high} population we observed that CD11b, CD11c and CD1c were expressed on HLA-DR^{high} cells, indicating that HLA-DR^{high} cells are dermal DC. These cells do not contain phagolysosomes, characteristics of macrophages. Moreover they present typical features of DC, *i.e.* a bean-shaped nuclei and surface dendrites, confirming that they were DDC and not macrophages (Figure 1c). Furthermore, these cells do not express langerin at the cell surface nor intracellularly confirming they were not LC that might have migrated into the dermis (data not shown). Interestingly, we observed that the HLA-DR^{low} CD45⁻ cells displayed markers of endothelial cells such as CD146, CD34, and CD31 (Figure 1b). Hence, HLA-DR^{low} population appeared to be dermal endothelial cells (HDMEC). To further investigate the characterisation of the DDC population, *i.e.* HLA-DR^{high} population, we purified exclusively DDC using a two step magnetic purification method. About 1.4 millions of DDC

were isolated using an indirect staining with CD1c antibody (Macs Miltenyi Biotech). Nevertheless, by our isolation method based on enzymatic dissociation of the dermis, we may purified both DDC and dermal macrophages, contrary to previous methods harvesting DC migrating from dermis explants (Furio et al., 2005; Nestle et al., 1993).

Fresh DDC express specific C-type lectin receptors MMR, DC-SIGN and Dectin-1 and express some Scavenger Receptors

Skin DDC are immature DC specialized in the recognition of signal dangers and pathogens. We thus examined the Pattern Recognition Receptor (PRR) profile of DDC. We first analyzed the expression of C-type Lectins (CLR). Langerin, a type II protein, is specifically expressed by LC (Valladeau et al., 2000), whereas BDCA-2 was shown to be expressed by plasmacytoid DC (Dzionek et al., 2001). We confirmed here that DDC clearly expressed MMR/CD206 (Turville et al., 2002). On the contrary, expression of DC-SIGN by freshly isolated DDC was low. Then, we investigated the expression of Dectin-1. Dectin-1 is a type II CLR containing an immunoreceptor tyrosine-based activation motif in its cytoplasmic tail, recently described on macrophages and on blood myeloid DC (Brown, 2006). Dectin-1 recognizes β -glucans and binds many fungal and it has been demonstrated *in vitro* and *in vivo* that Dectin 1 mediates antifungal cellular responses (Leibundgut-Landmann et al., 2007; Rogers et al., 2005; Taylor et al., 2007). For the first time, we revealed by immunohistochemistry, bright Dectin-1 positive cells within human dermis (Figure 2b). We did not observe any Dectin-1 positive Langerhans cells. Flow cytometry analysis confirmed that DDC, HLA-DR^{high}, expressed Dectin-1 (Figure 2c).

Then, we analysed the expression of scavenger receptors (SR). SR were first described on macrophages by their ability to bind Ox and Ac-LDL. They are also implicated in the recognition of various ligands derived from bacteria, viruses and host (Mukhopadhyay and

Gordon, 2004; Peiser et al., 2002). According to their multi-domain structures, they were divided into six different classes (A to F) (Krieger, 1997): Expression of SR by DC and especially by human DC is poorly defined. SRA, the first cloned SR, has been shown to be expressed on human *in vitro* generated DC (Harshyne et al., 2003). In addition, LOX-1 and SR-PSOX/CXCL16, ligand of CXCR6, were also shown to be expressed on human blood myeloid and MoDC (Delneste et al., 2002; Tabata et al., 2005). On the contrary MARCO and CLA-1 are not yet identified on human DC. To analyze SR expression, we used RT-PCR analysis as rare antibodies against human SR were available (Figure 2d). DDC clearly expressed SRA but lesser than macrophages. Furthermore, DDC expressed SR-PSOX/CXCL16 in similar levels as macrophages and a slight expression of CLA-1 was detected. Interestingly, DDC do not express MARCO, contrary to the bright expression revealed in macrophages. Therefore, as no specific macrophage markers exist in human, MARCO would be a remarkable candidate to clearly distinguish between macrophages and DDC.

Fresh DDC express TLR1, 2, 4 and TLR6 and TLR3 and TLR8

The TLR represent a family a type I transmembrane proteins which are essential for the recognition of PAMP and the induction of signalling cascades by the immune system. To date, 10 human TLR have been described. These receptors recognize a wide variety of molecules from diverse origins. Until now, the distribution of TLR in skin is hardly defined. We have recently demonstrated that freshly isolated LC expressed TLR1, 2, 3 and 6 (Flacher et al., 2006). In this study, we assessed TLR expression on DDC by real-time PCR as rare TLR antibodies were available. As controls, we included myeloid DC (mDC) and plasmacytoid DC (pDC) purified from human blood as TLR expression is well described in these cells, and added the negative fraction from the magnetic DDC purification composed

mainly of dermal fibroblasts (Figure 3a). The first six TLR members, excluded TLR3, principally recognize bacteria molecules: TLR1, 2 and 6 are mainly involved in the detection of molecules from Gram-positive bacteria (Schwandner et al., 1999) whereas TLR4 is the receptor of lipopolysaccharide from Gram-negative bacteria (Qureshi et al., 1999) and TLR5 for the flagellin derived from flagelled bacteria (Hayashi et al., 2001). Real-time PCR analysis showed that DDC expressed significant levels of TLR1, 2 and 6 and high level of TLR4. DDC do not express TLR5. The other TLR (TLR3, 7, 8 and 9) are specialized in the recognition of nucleic acids. DDC displayed high level of TLR3, receptor for double-stranded RNA (Kawai and Akira, 2006). They did not express TLR9 mRNA contrary to pDC which are characterised by the expression of TLR7 and TLR9. As it is undoubtedly proved that mDC do not express TLR7, we concluded that DDC do not also express TLR7. DDC expressed TLR8, intravesicular receptor of single strand nucleic acids or structurally related synthetic compounds (R-848, Imiquimod). This is of particular interest as LC do not express TLR8 (Flacher et al., 2006). To confirm this divergent TLR8 expression between DDC and LC, we generated CD34-derived DC (Figure 3b). At day 6 of the culture, CD1a⁺ and CD14⁺ cells were FACS-sorted as previously described (Caux et al., 1996). By classical RT-PCR, we demonstrated that only CD34-derived DDC expressed TLR8 mRNA.

Production of cytokines induced by TLR ligands and zymozan may help us to address the presence of functional TLR on DDC and DDC activation capacity (Figure 3c). DDC released high amount of IL-6 (1,7 ng/ml) in control medium, and IL-6 was more potently produced with Poly(IC) and with PGN. We next investigated the production of IL-10 and TNF- α . High amount of IL-10 were also measured in control medium. IL-10 production is induced by Poly (IC), PGN and zymozan while TNF- α secretion is only strongly induced by

Poly(IC). Cytokine secretion induced by Poly(IC) is concomitant with the bright TLR3 mRNA expression.

Fresh DDC efficiently take-up FITC-Dextran but low Ac-LDL

Immature DC are able to efficiently take up and process antigens. This function is a key function of immature DC. In Figure 2, we showed that freshly isolated DDC express innate receptors and in particular CLR such as MMR, DC-SIGN and Dectin-1. Thus, we examined DDC ability to take up fluorescently labelled dextran. First, we analysed CD34-derived DC (CD34-DC) generated in GM-CSF and IL-4 and monocyte-derived DC (MoDC) phenotype, as these *in vitro* generated DC are mainly used in vaccination strategies as DC models. As shown in Figure 4a, CD34-DC and MoDC expressed high level of CD1a, intermediate level of HLA-DR and no CD14. Besides they displayed high DC-SIGN and MMR, contrary to DDC. This difference may be due to the presence of IL-4 during our CD34-DC and MoDC culture (Steinbach et al., 1998). We demonstrated in Figure 4b that *in vitro* generated DC showed high levels of endocytic activity whereas DDC internalised less particles, certainly due to their higher expression of surface C-type lectins. Then, we analysed DDC capacity to internalize Alexa488-Ac-LDL to study their expression of functional SR. As shown in Figure 4c, uptake of Ac-LDL by DDC was low whereas monocyte-derived macrophages, used as control, did endocytose Ac-LDL with a bright efficiency. This result was in accordance with the SR expression level in DDC which is much weaker than in macrophages.

DISCUSSION

Although LC are well characterized and studied, only few data concerning DDC are available. Indeed, purifying DDC from total dermis is difficult but cells obtained by this technique are very different from those obtained after skin explants migration. Indeed, our DDC do not express CD40, CD80, CD83 and CD86 (not shown) contrary to DDC collected after migration, which have already begun a maturation process (Furio et al., 2005; McLellan et al., 1998). In contrast to other groups, we did not observe any langerin positive cells within the DDC population, contrary to Angel *et al.* who demonstrated in a recent study that 11% of the HLA-DR⁺ cells were langerin positive (Angel et al., 2006). Furthermore, our results were in disagreement with those of Larregina *et al.* (Larregina et al., 2001), who isolated cells from total skin explants and demonstrated that CL were CD1a⁺ CD14⁻, DDC were CD1a⁻ CD14⁻ and the last population CD14⁺ were LC precursors (Larregina et al., 2001; Morelli et al., 2005). In our study, freshly isolated DDC did not expressed CCR7, in contrast to Angel *et al.* (Angel et al., 2006). Finally, we did not detect any plasmacytoid DC in the dermal cell suspension, based on BDCA2 expression, contrary to the work of Ebner *et al.* (Ebner et al., 2004), as previously demonstrated by Wollenberg *et al.* (Wollenberg et al., 2002).

To date, few specific markers of human macrophages or human DDC exist. Previously, DC-SIGN was defined as the specific marker of the dermal DC population (Geijtenbeek et al., 2000b) as langerin for LC (Valladeau et al., 2000). Nevertheless, recent studies demonstrated that macrophages can also expressed DC-SIGN (Granelli-Piperno et al., 2005; Soilleux et al., 2002). Furthermore, CD36 was demonstrated to be expressed on the dermal macrophages population (Gonzalez-Ramos et al., 1996), however, CD36 was also shown to be expressed by DDC (Furio et al., 2005; Nestle et al., 1993). Thus, as macrophages do not express CD1c, we used CD1c to phenotypically distinguished dermal DC from dermal

macrophages (Furio et al., 2005; Lenz et al., 1993). Besides, the absence of phagolysosomes and low ability to endocytose ac-LDL confirmed that we did not isolated macrophages. Furthermore, we showed that mRNA of the SR MARCO is specifically expressed on macrophages. Thus, MARCO would provide an interesting marker to differentiate macrophages from DDC.

In this paper, we demonstrated that DDC express a specific PRR profile. First, DDC clearly express MMR and Dectin-1. We provided here that DDC did not display the same TLR pattern. DDC expressed TLR1, 2, 4 and 6 and high levels of TLR3, and 8, whereas LC expressed TLR1, 2, 3, 5 and 6 (Flacher et al., 2006). Recently, Van der Aar *et al.* described the TLR profile of dermal DC, freshly purified through their expression of CD11c (van der Aar et al., 2007). They demonstrated that DDC express all TLR except TLR9 and 10. Contrary to them, we may have failed to detect TLR5 expression on DDC, as its expression seems to be very low. Furthermore, comparing TLR7 expression between LC {Flacher, 2006 #1499} and DDC, our results were in agreement with those of Van der Aar *et al.*, who showed that DDC expressed more TLR7 than LC.

DDC expressed specific CLR shown to be implicated in HIV binding such as DC-SIGN (Curtis et al., 1992; Geijtenbeek et al., 2000a; Turville et al., 2002), and MMR (Turville et al., 2002). We showed here that DDC expressed HIV co-receptor CCR5 and CXCR4 as CL (Zaitseva et al., 1997) and demonstrated that they displayed mRNA of SR-PSOX/CXCL16, ligand of the HIV minor co-receptor CXCR6/Bonzo (Tabata et al., 2005) (Matloubian et al., 2000). Besides, TLR8, ligand of single strand nucleic acid or structurally related synthetic compounds (Heil et al., 2004), can be triggered by HIV single strand RNA (Diebold et al.,

2004). Therefore, DDC express different PRR involved in the recognition of virus such as HIV, indicating that they might be specialized in recognition of virus.

Innate receptors may collaborate together for the recognition of pathogens and for the activation of inflammatory responses. It has been shown recently that TLR2 can collaborate with Dectin-1 for the recognition of fungal (Gantner et al., 2005; Netea et al., 2006). In addition, SR-PSOX/CXCL16 favour CpG ODN-D endocytosis leading to TLR9 dependent IFN- α secretion by pDC (Gursel et al., 2006). Another example is provided by CD36 which is associated with heterodimers TLR2/6 and TLR1/2 for the recognition of di or tri-acetylated lipoproteins {Triantafilou, 2006 #3697}.

Although viral and microbial pathogens are mainly detected by the TLR family, viral infection, in particular, can also be detected by TLR-independent mechanisms (Akira et al., 2006). The newly described cytosolic DExD/H Box RNA helicases, RIG-I and MDA-5, were shown to recognize viral double-stranded RNA (Andrejeva et al., 2004; Yoneyama et al., 2004). These receptors may be preferentially used for the recognition of virus by mDC (Kato et al., 2005). Thus, to further characterize the role of DDC in the recognition of virus, it would be of great interest to examine the expression of these receptors and their potential interaction with other PRR in the initiation of anti-viral responses.

Previous studies on human DDC showed that they were potent stimulators of T cell proliferation (Furio et al., 2005; Nestle et al., 1998; Sepulveda-Merrill et al., 1994). Studies in mice depleted of LC pointed out that after contact hypersensitivity immune responses were still occurring, indicating that they were mediated by other immune cells such as DDC (Bennett et al., 2005; Kissenpfennig et al., 2005a). Besides, after inoculation of vagina mucosa with Herpes Simplex Virus (HSV2), submucosal DC, equivalent to DDC, were

recruited beneath the infected epithelium and were responsible for the presentation of HSV2 peptides to CD4⁺ T cells (Zhao et al., 2003). Moreover, after skin inflammation, it has been demonstrated that dermal DC migrated faster to lymph nodes than LC and colonized distinct areas (Kissenpfennig et al., 2005a). Therefore, DDC seem to respond differently than LC to skin infection or immunization and may induce different adaptative immune responses.

To summarize, our work focused on the expression of innate receptors by freshly isolated human DDC. We demonstrated that they presented a profile of innate receptors specialized in the recognition different pathogens. Hence, based on its PRR profile, DDC might play an important role in initiating the immune response. Today, vaccination, which is under intensive investigation, employs, in skin, either direct intracutaneous injection of antigen or injection of antigen-loaded DC, generally *in vitro* generated DC. However, these *in vitro* generated DC may not respond exactly in the same way as *in vivo* dermal DC. Thus, a better characterisation of DDC and a better comprehension of their role in skin immunity would improve their exploitation in vaccination strategies.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Dr. E. Weill and his clinical staff in Lyon, who provided us with the skin samples. We wish to thank Ali Amara and Fernando Arenzana-Seisdedos who provided us the 1B10 anti-DC-SIGN antibody.

REFERENCES

- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**:783-801.
- Allan RS, Smith CM, Belz GT, van Lint AL, Wakim LM, Heath WR, et al. (2003) Epidermal viral immunity induced by CD8alpha+ dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science* **301**:1925-1928.
- Andrejeva J, Childs KS, Young DF, Carlos TS, Stock N, Goodbourn S, et al. (2004) The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:17264-17269.
- Angel CE, George E, Brooks AE, Ostrovsky LL, Brown TL, Dunbar PR (2006) Cutting edge: CD1a+ antigen-presenting cells in human dermis respond rapidly to CCR7 ligands. *J Immunol* **176**:5730-5734.
- Bennett CL, van Rijn E, Jung S, Inaba K, Steinman RM, Kapsenberg ML, et al. (2005) Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity. *J Cell Biol* **169**:569-576.
- Brown GD (2006) Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol* **6**:33-43.
- Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant C, de Saint-Vis B, Jacquet C, et al. (1996) CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med* **184**:695-706.
- Curtis BM, Scharnowske S, Watson AJ (1992) Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:8356-8360.
- Delneste Y, Magistrelli G, Gauchat J, Haeuw J, Aubry J, Nakamura K, et al. (2002) Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity* **17**:353-362.
- Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C (2004) Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**:1529-1531.
- Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, et al. (2001) BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med* **194**:1823-1834.
- Ebner S, Ehammer Z, Holzmann S, Schwingshackl P, Forstner M, Stoitzner P, et al. (2004) Expression of C-type lectin receptors by subsets of dendritic cells in human skin. *Int Immunol* **16**:877-887.
- Flacher V, Bouschbacher M, Verronese E, Massacrier C, Sisirak V, Berthier-Vergnes O, et al. (2006) Human Langerhans cells express a specific TLR profile and differentially respond to viruses and Gram-positive bacteria. *J Immunol* **177**:7959-7967.
- Furio L, Berthier-Vergnes O, Ducarre B, Schmitt D, Peguet-Navarro J (2005) UVA radiation impairs phenotypic and functional maturation of human dermal dendritic cells. *The Journal of investigative dermatology* **125**:1032-1038.
- Gantner BN, Simmons RM, Underhill DM (2005) Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *Embo J* **24**:1277-1286.
- Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, et al. (2000a) DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* **100**:587-597.

- Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y, et al. (2000b) Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* **100**:575-585.
- Gonzalez-Ramos A, Cooper KD, Hammerberg C (1996) Identification of a human dermal macrophage population responsible for constitutive restraint of primary dermal fibroblast proliferation. *The Journal of investigative dermatology* **106**:305-311.
- Granelli-Piperno A, Pritsker A, Pack M, Shimeliovich I, Arrighi JF, Park CG, et al. (2005) Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin/CD209 is abundant on macrophages in the normal human lymph node and is not required for dendritic cell stimulation of the mixed leukocyte reaction. *J Immunol* **175**:4265-4273.
- Gursel M, Gursel I, Mostowski HS, Klinman DM (2006) CXCL16 influences the nature and specificity of CpG-induced immune activation. *J Immunol* **177**:1575-1580.
- Harshyne LA, Zimmer MI, Watkins SC, Barratt-Boyes SM (2003) A role for class A scavenger receptor in dendritic cell nibbling from live cells. *J Immunol* **170**:2302-2309.
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, et al. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**:1099-1103.
- Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, et al. (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**:1526-1529.
- Jarrossay D, Napolitani G, Colonna M, Sallusto F, Lanzavecchia A (2001) Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* **31**:3388-3393.
- Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, et al. (2001) Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* **194**:863-869.
- Kaplan DH, Jenison MC, Saeland S, Shlomchik WD, Shlomchik MJ (2005) Epidermal langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity. *Immunity* **23**:611-620.
- Kato H, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, Matsui K, et al. (2005) Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* **23**:19-28.
- Kawai T, Akira S (2006) Innate immune recognition of viral infection. *Nature immunology* **7**:131-137.
- Kissenpfennig A, Ait-Yahia S, Clair-Moninot V, Stossel H, Badell E, Bordat Y, et al. (2005a) Disruption of the langerin/CD207 gene abolishes Birbeck granules without a marked loss of Langerhans cell function. *Mol Cell Biol* **25**:88-99.
- Kissenpfennig A, Henri S, Dubois B, Laplace-Builhe C, Perrin P, Romani N, et al. (2005b) Dynamics and function of Langerhans cells in vivo dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity* **22**:643-654.
- Kodama T, Freeman M, Rohrer L, Zabrecky J, Matsudaira P, Krieger M (1990) Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature* **343**:531-535.
- Krieger M (1997) The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. *Curr Opin Lipidol* **8**:275-280.
- Larregina AT, Morelli AE, Spencer LA, Logar AJ, Watkins SC, Thomson AW, et al. (2001) Dermal-resident CD14+ cells differentiate into Langerhans cells. *Nature immunology* **2**:1151-1158.

- Leibundgut-Landmann S, Gross O, Robinson MJ, Osorio F, Slack EC, Tsoni SV, et al. (2007) Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nature immunology* **8**:630-638.
- Lenz A, Heine M, Schuler G, Romani N (1993) Human and murine dermis contain dendritic cells. Isolation by means of a novel method and phenotypical and functional characterization. *J Clin Invest* **92**:2587-2596.
- Matloubian M, David A, Engel S, Ryan JE, Cyster JG (2000) A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nature immunology* **1**:298-304.
- McLellan AD, Heiser A, Sorg RV, Fearnley DB, Hart DN (1998) Dermal dendritic cells associated with T lymphocytes in normal human skin display an activated phenotype. *The Journal of investigative dermatology* **111**:841-849.
- Morelli AE, Rubin JP, Erdos G, Tkacheva OA, Mathers AR, Zahorchak AF, et al. (2005) CD4+ T cell responses elicited by different subsets of human skin migratory dendritic cells. *J Immunol* **175**:7905-7915.
- Mukhopadhyay S, Gordon S (2004) The role of scavenger receptors in pathogen recognition and innate immunity. *Immunobiology* **209**:39-49.
- Nestle FO, Filgueira L, Nickoloff BJ, Burg G (1998) Human dermal dendritic cells process and present soluble protein antigens. *The Journal of investigative dermatology* **110**:762-766.
- Nestle FO, Zheng XG, Thompson CB, Turka LA, Nickoloff BJ (1993) Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *J Immunol* **151**:6535-6545.
- Netea MG, Gow NA, Munro CA, Bates S, Collins C, Ferwerda G, et al. (2006) Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest* **116**:1642-1650.
- Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S (2002) Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* **14**:123-128.
- Qureshi ST, Lariviere L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P, et al. (1999) Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med* **189**:615-625.
- Rogers NC, Slack EC, Edwards AD, Nolte MA, Schulz O, Schweighoffer E, et al. (2005) Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* **22**:507-517.
- Sallusto F, Lanzavecchia A (1994) Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* **179**:1109-1118.
- Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ (1999) Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* **274**:17406-17409.
- Sepulveda-Merrill C, Mayall S, Hamblin AS, Breathnach SM (1994) Antigen-presenting capacity in normal human dermis is mainly subserved by CD1a+ cells. *Br J Dermatol* **131**:15-22.
- Soilleux EJ, Morris LS, Leslie G, Chehimi J, Luo Q, Levroney E, et al. (2002) Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro. *J Leukoc Biol* **71**:445-457.
- Steinbach F, Krause B, Blass S, Burmester GR, Hiepe F (1998) Development of accessory phenotype and function during the differentiation of monocyte-derived dendritic cells. *Res Immunol* **149**:627-632.
- Steinman RM (2003) The control of immunity and tolerance by dendritic cell. *Pathol Biol (Paris)* **51**:59-60.

- Tabata S, Kadowaki N, Kitawaki T, Shimaoka T, Yonehara S, Yoshie O, et al. (2005) Distribution and kinetics of SR-PSOX/CXCL16 and CXCR6 expression on human dendritic cell subsets and CD4⁺ T cells. *J Leukoc Biol* **77**:777-786.
- Taylor PR, Tsoni SV, Willment JA, Dennehy KM, Rosas M, Findon H, et al. (2007) Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nature immunology* **8**:31-38.
- Tse Y, Cooper KD (1990) Cutaneous dermal Ia⁺ cells are capable of initiating delayed type hypersensitivity responses. *The Journal of investigative dermatology* **94**:267-272.
- Turville SG, Cameron PU, Handley A, Lin G, Pohlmann S, Doms RW, et al. (2002) Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nature immunology* **3**:975-983.
- Valladeau J, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C, Moore K, Kleijmeer M, Liu Y, et al. (2000) Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* **12**:71-81.
- van der Aar AM, Sylva-Steenland RM, Bos JD, Kapsenberg ML, de Jong EC, Teunissen MB (2007) Loss of TLR2, TLR4, and TLR5 on Langerhans cells abolishes bacterial recognition. *J Immunol* **178**:1986-1990.
- Wollenberg A, Wagner M, Gunther S, Towarowski A, Tuma E, Moderer M, et al. (2002) Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. *The Journal of investigative dermatology* **119**:1096-1102.
- Yokota K, Takashima A, Bergstresser PR, Ariizumi K (2001) Identification of a human homologue of the dendritic cell-associated C-type lectin-1, dectin-1. *Gene* **272**:51-60.
- Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, et al. (2004) The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature immunology* **5**:730-737.
- Zaitseva M, Blauvelt A, Lee S, Lapham CK, Klaus-Kovtun V, Mostowski H, et al. (1997) Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nat Med* **3**:1369-1375.
- Zhao X, Deak E, Soderberg K, Linehan M, Spezzano D, Zhu J, et al. (2003) Vaginal submucosal dendritic cells, but not Langerhans cells, induce protective Th1 responses to herpes simplex virus-2. *J Exp Med* **197**:153-162.

FIGURES LEGENDS

Figure 1: Dermal dendritic cells and microvascular endothelial cells are present in the HLA-DR positive populations of the dermis.

- (a) HLA-DR staining of total dermal cell suspension analysed by flow cytometry shows two HLA-DR positive populations (R1 and R2). Open histogram represent the isotype match control.
- (b) Flow cytometry staining on total dermal suspension. One representative dot for each marker is shown.
- (c) May-Grünwald-Giemsa coloration of DDC. Scale bars: 1 μ m.
- (d) Electron microscopy of DDC showing the multilobed nucleus, their long dendrites and the absence of phagolysosomes. Scale bars: 1 μ m.

Figure 2: DDC express specific C-type lectins and scavenger receptors

- (a) Flow cytometry staining of the dermal suspension with MMR, DC-SIGN clone 120507 and DC-SIGN clone 1B10. One representative dot is shown.
- (b) Immunohistochemistry on normal human skin with Dectin-1. Magnification x 200.
- (c) Expression of Dectin-1 on total dermal cell suspension.
- (d) RT-PCR analysis of scavenger receptor expression on DDC (lanes 1-4) and monocyte-derived macrophages (lanes 5-7). Each lane represents different donors.

Figure 3: DDC express TLR1, 2, 4, 6 and TLR3 and TLR8.

- (a) Real-time quantitative PCR were performed on cDNA obtained from fibroblasts, purified HLA-DR⁺ cells, CD11c⁻ pDC, and CD11c⁺ mDC. Results were expressed as copy numbers for 10⁵ copies of 18S ribosomal RNA.

- (b) RT-PCR of CD34-derived LC and CD34-derived DDC of TLR7, 8, 9 and 10. Results were analysed on two independent donors (1 and 2)
- (c) Freshly isolated DDC were cultured in medium alone or with 10 μ M R848, 10 μ g/ml Poly(IC), 10 μ g/ml PGN or 100 μ g/ml zymozan. After 24 hours of culture, supernatants were harvested and cytokine production was quantified by CBA assay (IL-6, IL-10 and TNF- α). Results were analysed on three independent donors.

Figure 4: DDC endocytose dextran and Ac-LDL but less efficiently than *in vitro* generated DC and macrophages.

- (a) Flow cytometry analysis of CD34-derived DC (CD34-DC) and monocyte-derived DC (MoDC) phenotype.
- (b) Comparison of the endocytic capacity of DDC, MoDC and CD34-DC using FITC-Dextran.
- (c) Uptake of Alexa 488-AcLDL by DDC and monocyte-derived macrophages

Table 1 Sequences of primers used for semi-quantitative RT-PCR analysis.

Table 2: Sequences of primers and probes used for real-time quantitative PCR.

The quencher dye, TAMRA, was placed at the 3' end of probes. The reporter dyes, linked to the 5' end, were HEX, FAM or VIC (18S ribosomal RNA)

Table 1: Primers used for semi-quantitative RT-PCR analysis

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
CLA1	CGG CGG TGA TGA TGC AGA AT	GGC GTT GAG GAA GTG AGG ATG
LOX1	ACT GGA GGG ACA GAT CTC AGC	GGC ACC CAA GTG ACA AAG AAT
MARCO	TCA ATG TTC CAA AGC CCA AGA	GCC TGT TGC TCC ATC TCG TC
SRA	ACT GAT AGC TGC TCC GGA ATC T	GGT CTG AGA ATG TTC CCA ATC
SR-PSOX	CTC CTG AAC CGA ACC GAA TC	GTT TCA TTG GGA CGA GTG AGC
β-actin	GGA GCA ATG ATC TTG ATC TTC	AAG ATG ACC CAG ATC ATG TTT GAG

Table2 : Primers and probes used for Taqman analysis

The reporter dye, placed on the 5' end of the probes, was HEX for TLR5, 6, 7, 8, 10, FAM for the CD4 promoter, TLR1, 2, 3, 4, 9, and VIC for 18S rRNA . At the 3' end of all probes, the quencher dye was TAMRA

Gene	Forward primer (5'-3')	TaqMan Probe	Reverse primer (5'-3')
TLR1	CCC ATT CCG CAG TAC TCC AT	[5'FAM] AGC TCA AAA GTC TCA TGG CCA GGA GGA[3'TAMRA]	TTT TCC TTG GGC CAT TCC A
TLR2	CCC ATT GCT CTT TCA CTG CT	[5'FAM] GTA GTT GTG GGT TGA AGC ACT GGA CAA T [3' TAMRA]	CTT CCT TGG AGA GGC TGA TG
TLR3	TGG TTG GGC CAC CTA GAA GTA	[5'FAM] ACC TGG GCC TTA ATG AAA TTG GGC AA [3'TAMRA]	TCT CCA TTC CTG GCC TGT G
TLR4	CTG CAA TGG ATC AAG GAC CA	[5'FAM] AGG CAG CTC TTG GTG GAA GTT GAA CG [3'TAMRA]	TTA TCT GAA GGT GTT GCA CAT TCC
TLR5	TGC CTT GAA GCC TTC AGT TAT G	[5'HEX] CCA GGG CAG GTG CTT ATC TGA CCT TAA CA [3'TAMRA]	CCA CCA CCA TGA TGA GAG CA
TLR6	CCC TCA ACC ACA TAG AAA CG	[5'HEX] ACC GAC TTG GAA ATG CCT GGT CAG [3'TAMRA]	GAG ATA TTC CAC AGG TTT GG
TLR7	TTA CCT GGA TGG AAA CCA GCT ACT	[5'HEX] AGA TAC CGC AGG GCC TCC CGC [3'TAMRA]	TCA AGG CTG AGA AGC TGT AAG CTA
TLR8	AAC TTT CTA TGA TGC TTA CAT TTC TTA TGA C	[5'HEX] CCA AAG ATG CCT CTG TTA CTG ACT GGG TG[3'TAMRA]	GGT GGT AGC GCA GCT CAT TT
TLR9	TGA AGA CTT CAG GCC CAA CTG	[5'FAM] AGC ACC CTC AAC TTC ACC TTG GAT CTG TC [3'TAMRA]	TGC ACG GTC ACC AGG TTG T
TLR10	TTT GAT CTG CCC TGG TAT CTC A	[5'HEX] AGG TCA ATG CAC ACA AAC ATG GCA CA [3'TAMRA]	AGT TGT TCT TGG GTT GTT TTC CTA AC
CD4 promoter	TTC CAC ACT GGG CCA CCT AT	[5'FAM] CAC TGG ACA CAA TTG CCC TCA GG [3'TAMRA]	TTG TGG GCT TAC CAC TGC TG

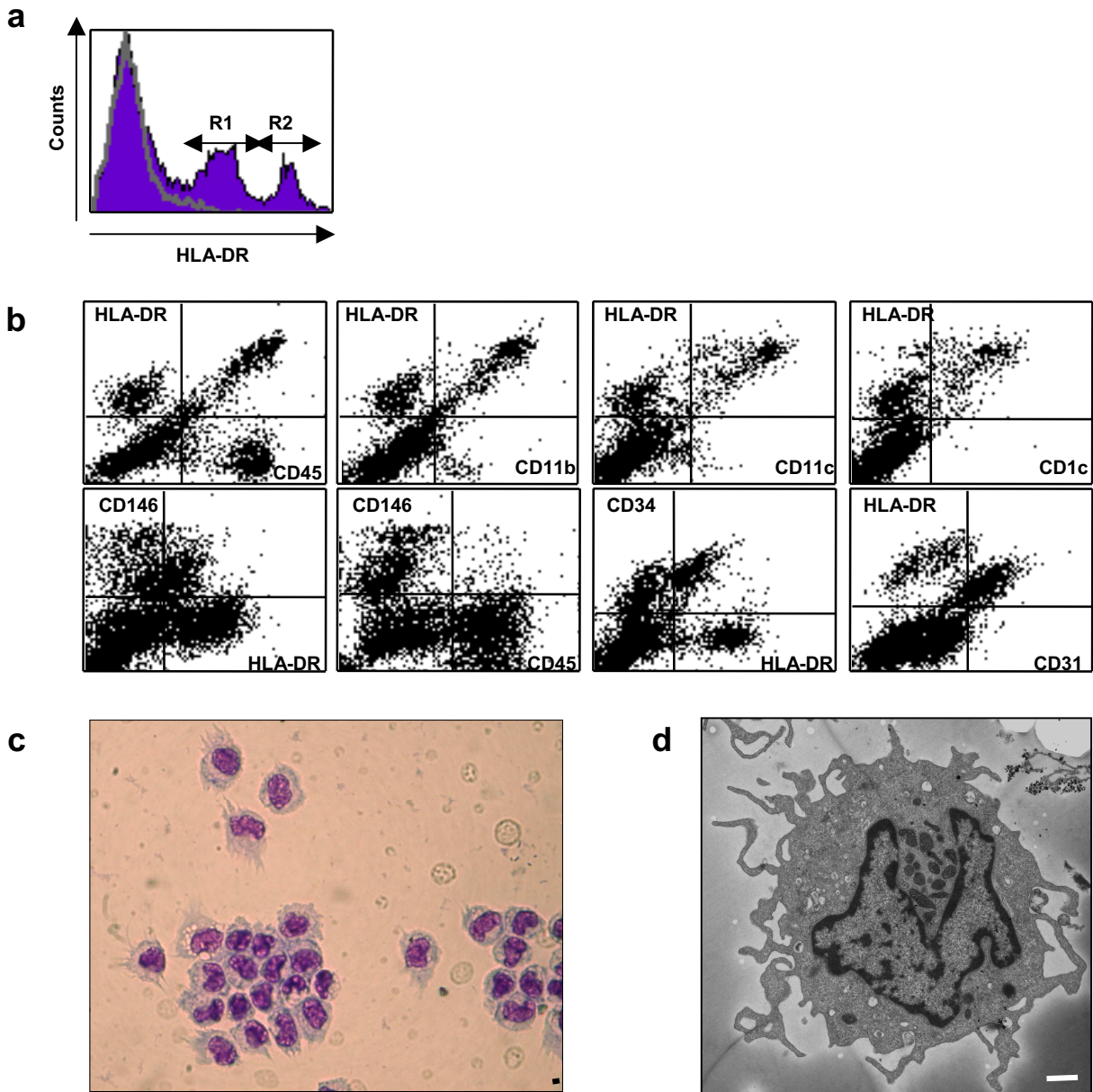


FIGURE 1

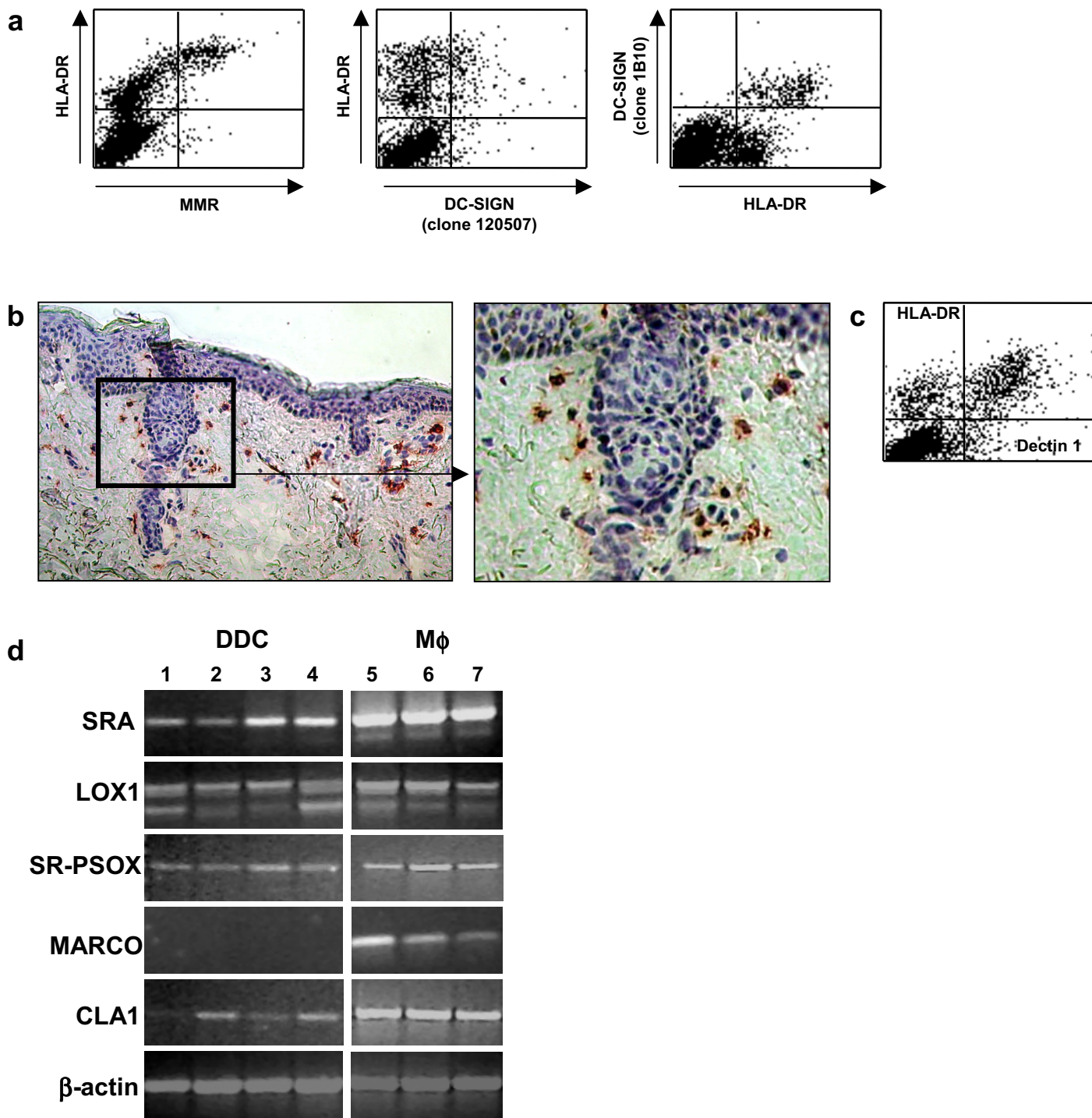


FIGURE 2

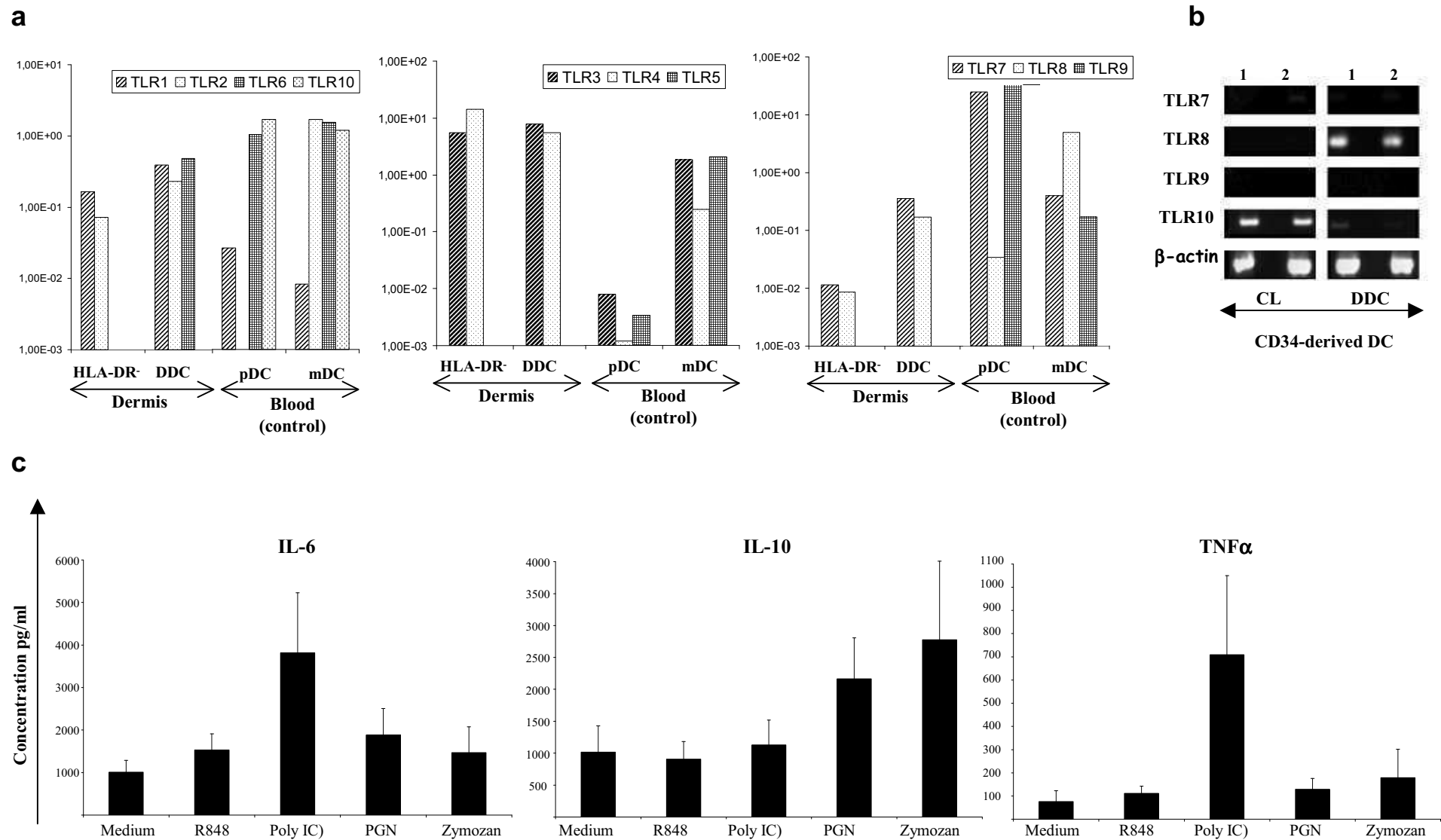


FIGURE 3

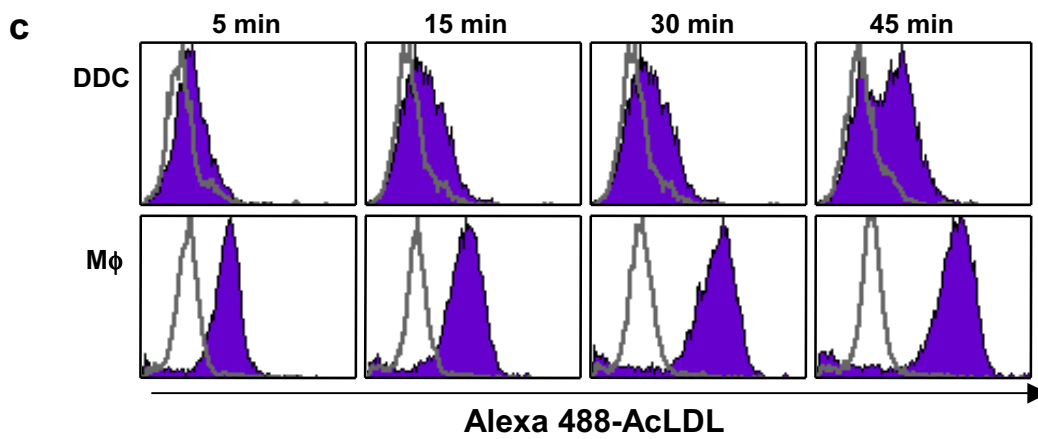
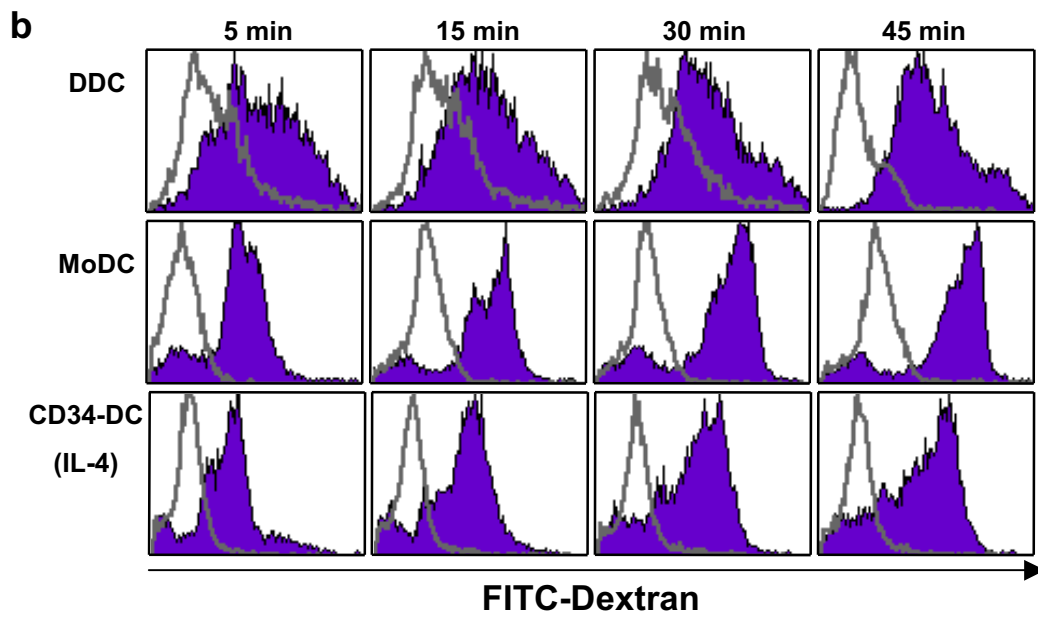
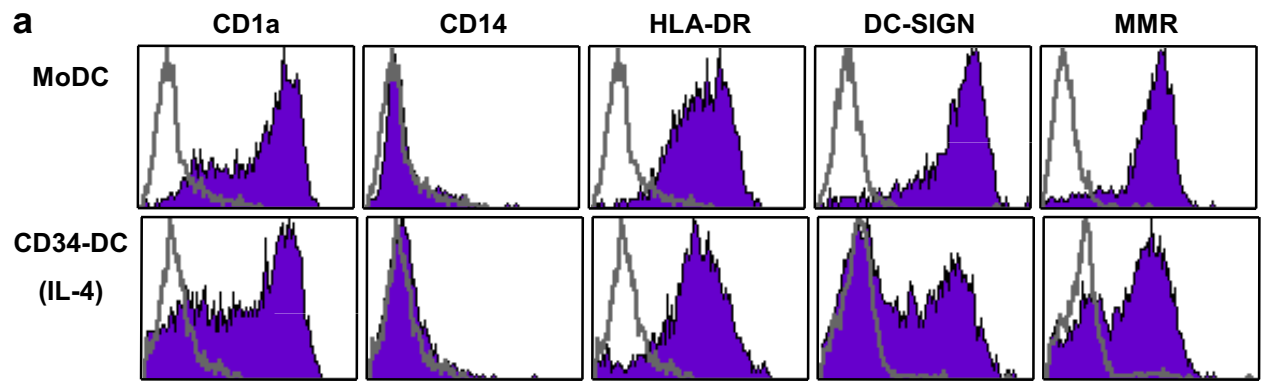


FIGURE 4

C. Discussion: expression des récepteurs de l'immunité innée par les cellules dendritiques cutanées

1. Le modèle : les cellules dendritiques cutanées humaines fraîchement isolées

Nous avons axé notre travail de caractérisation du profil d'expression des récepteurs de l'immunité innée par les DC cutanées en travaillant uniquement sur les CL et DDC humaines fraîchement isolées. Bien que très physiologique, ce travail comporte de nombreuses difficultés. La première est l'accès au prélèvement de peau humaine normale et les contraintes liées aux lois de Bioéthique. Nos prélèvements proviennent majoritairement de déchets opératoires d'abdominoplastie. La seconde difficulté repose sur le rendement cellulaire qui est très faible. En effet, pour $620 \pm 160 \text{ cm}^2$, nous récoltons $58,7 \pm 33,3 \cdot 10^6$ cellules totales du derme, soit en moyenne $1,4 \cdot 10^6$ DDC. De plus la viabilité cellulaire est faible (nous en reparlerons ultérieurement). Enfin, la dernière difficulté est liée à la très grande variabilité inter-individuelle, la reproductibilité des expériences étant alors plus complexe.

2. Caractérisation des cellules dendritiques dermiques

a. Les cellules exprimant HLA-DR dans le derme

Afin de caractériser les DDC de derme humain, nous avons utilisé une technique basée sur la dissociation enzymatique du derme comme décrit par L. Meunier (Meunier et al., 1993). L'analyse de la population dermique totale a révélé l'existence de deux populations HLA-DR positive : une population HLA-DR^{forte} et une population HLA-DR^{faible}. Le reste de la population dermique, HLA-DR négative, est essentiellement constituée de fibroblastes et de lymphocytes T (Figure 1 supplémentaire).

Dans l'article 2, nous avons établi que la population HLA-DR^{forte} représente la population de DC du derme, tandis que la population HLA-DR^{faible} une population de cellules endothéliales du derme (HDMEC, *Human Dermal Microvascular Endothelial Cells*). Une étude récente de Angel et coll. a confirmé qu'au sein du derme, différentes populations cellulaires expriment HLA-DR, dont des cellules endothéliales (Angel et al., 2007). Nous avons également observé que ces cellules expriment des marqueurs spécifiques des cellules endothéliales tels que CD31 et CD146. Angel et coll. ont, quant à eux, confirmés que les

cellules endothéliales des vaisseaux sanguins expriment HLA-DR, par marquages fluorescents sur coupe de peau humaine normale. Ils ont, de plus, établi qu'une sous-population de cellules endothéliales lymphatiques podoplanin⁺ exprime HLA-DR (Angel et al., 2007).

Par ailleurs, nous n'avons détecté dans le derme aucune DC plasmacytoïde, aucun marquage positif pour BDCA2 ni CD123 n'ayant été observé sur suspension totale dermique, contrairement au travail de l'équipe de N. Romani (Ebner et al., 2004). En effet, les pDC, seraient absentes de la peau normale, et seraient recrutées uniquement dans des conditions inflammatoires telles que dans le psoriasis (Wollenberg et al., 2002). Les pDC observées dans la peau de sein par l'équipe de N. Romani sont rares. Cela peut s'expliquer par un léger état inflammatoire de leur prélèvement de peau ou par la localisation anatomique différente de la notre.

b. Les cellules dendritiques dermiques

b.1. Phénotype hétérogène

En accord avec les travaux de Turville et coll., nous avons démontré l'existence au sein du derme de deux populations basées sur l'expression de CD1a et CD14 (Turville et al., 2002). En effet, deux populations sont retrouvées : une population CD1a^{fort} CD14^{faible} et une population CD1a^{faible} CD14^{fort} (Figure 2 supplémentaire). Les travaux du groupe de A. Larregina ont également observé cette dichotomie, mais de manière plus stricte : CD1a⁺ CD14⁻ et CD1a⁻ CD14⁺ (Larregina et al., 2001). Cependant, Larregina et coll. utilisent des cellules migrantes d'explants de peau totale, contrairement à Turville et coll. qui dissocient le derme de l'épiderme puis effectuent une digestion enzymatique, comme nous l'avons présenté dans ce travail. Par ailleurs, les variations de sensibilité de fluorescence entre la fluorescéine et la phycoérythrine pourraient expliquer les divergences d'expression retrouvées, notamment entre un marquage négatif et un marquage faiblement positif.

La population de DDC, HLA-DR^{forte}, exprime spécifiquement CD1c, CD11b et CD11c. Nous avons alors isolé les DDC *via* une purification magnétique indirecte en utilisant un anticorps anti-CD1c. Nous avons confirmé que ces DC HLA-DR^{forte} CD1c⁺ ne sont pas des CL ayant migré dans le derme, car ces cellules sont dépourvues de granules de Birbeck et de marquage langerin (en surface et en intra-cytoplasmique) (Figure 2 b supplémentaire). Au

contraire, une étude récente révèle que 11% des cellules HLA-DR⁺ du derme exprimeraient la langerin (Angel et al., 2006). La technique de purification des DDC mis au point par Angel et coll. explique ce fort taux de cellules langerin⁺ retrouvées dans le derme. En effet, après digestion enzymatique, le derme est séparé de l'épiderme, puis il est incubé seize heures avant la purification des cellules dermiques. Or après digestion enzymatique, il est difficile de séparer le derme de l'épiderme convenablement. Ainsi, les cellules langerin⁺ détectées pourraient être des CL épidermiques, présentes au sein des fragments d'épiderme mal séparés du derme (Angel et al., 2006). D'autre part, l'origine du prélèvement de peau (sein *versus* abdomen) pourrait également expliquer cette divergence. Par ailleurs, Angel et coll. établissent que les DDC expriment fortement CCR7 et migrent en réponse à CCL19 et CCL21. Au contraire, les DDC que nous avons isolées, n'expriment pas CCR7 mais seulement CCR1, CCR2, CCR5, CXCR1 et CXCR4 (Figure 3 supplémentaire).

Comme observé précédemment, dans la littérature, deux techniques différentes sont retrouvées pour isoler les DDC. La première consiste à utiliser des cellules ayant émigré d'explants de derme (Lenz et al., 1993; Nestle et al., 1993; Furio et al., 2005), tandis que la seconde étudie les DDC isolées après digestion enzymatique du derme (Meunier et al., 1993). Des divergences apparaissent donc selon la technique utilisée. Par exemple, les DDC isolées par migration d'explants dermiques présentent une expression plus forte des marqueurs de maturation CD40, CD80, CD83 et CD86 contrairement aux DDC isolées par digestion du derme (nos résultats Figure 4 supplémentaire et (McLellan et al., 1998; Furio et al., 2005)). Ainsi les DDC se seraient activées spontanément lors de leur migration. Cependant, bien qu'induisant une certaine activation des DDC, la technique utilisant des cellules migrantes à partir d'explants de derme prévient l'isolement de macrophages dermiques (Gonzalez-Ramos et al., 1996; Meunier et al., 1993).

b.2. Distinction avec les macrophages

Chez l'homme, peu de marqueurs spécifiques sont disponibles pour distinguer clairement en cytométrie en flux ou par immuno-histochimie les macrophages dermiques des DDC. DC-SIGN, préalablement identifié comme récepteur spécifique des DC interstitielles (Geijtenbeek et al., 2000), est également exprimé par différentes populations de macrophages humains (Soilleux et al., 2002; Granelli-Piperno et al., 2005). L'expression de

CD36 a également été décrite à la fois sur les macrophages dermiques (Gonzalez-Ramos et al., 1996) et sur les DDC (Nestle et al., 1998; Furio et al., 2005).

Comment distinguer clairement les DDC des macrophages dermiques ? Nous avons, comme précédemment expliqué, isolé les DDC *via* leur expression de CD1c. Plusieurs résultats distincts ont permis de clairement établir que les cellules ainsi isolées ne sont pas des macrophages mais des DDC : absence de phagolysosomes, présence de toutes les caractéristiques morphologiques des DDC, faible endocytose d'Ac-LDL. Nos travaux sont en accord avec les travaux de L. Meunier et A. Gonzalez-Ramos, qui avaient précédemment défini dans le derme cette population de DDC CD11c⁺ CD1c⁺ et la population de macrophages CD11c^{faible} et CD1c.

L'étude de l'expression des récepteurs *scavengers* a révélé que les DDC n'expriment pas MARCO, contrairement aux macrophages. Cette expression spécifique est très intéressante, puisque MARCO pourrait alors être utilisé comme marqueur spécifique des macrophages. Ce résultat devrait toutefois être confirmé par l'utilisation d'un anticorps humain anti-MARCO, à la fois par cytométrie en flux sur les DDC et sur la population dermique totale et par immuno-marquages sur coupes de peau, en double marquage avec CD1c par exemple.

c. Viabilité en culture

Les cellules dendritiques humaines primaires sont difficiles à cultiver. Nous avons étudié la viabilité des DDC fraîchement isolées en culture afin de pouvoir réaliser diverses expériences nécessitant une mise en culture (activation et culture lymphocytaire mixte). Les résultats sont présentés dans la figure 5 supplémentaire. La viabilité des DDC décroît rapidement pour passer de 74,9% ± 8,8 après purification à 34,7% ± 3,1 à 24 heures de culture. Nous avons alors tenté d'améliorer cette faible viabilité par l'addition de cytokines (Figure 5a supplémentaire). En effet, certaines cytokines utilisées pour la génération *in vitro* de DC telles que le GM-CSF ont été décrites pour leur capacité à induire la différenciation et la survie des DC du sang périphérique par exemple (Markowicz and Engleman, 1990). Cependant, quelque soit la cytokine ou la combinaison de cytokines utilisée, aucune amélioration de la viabilité n'a été détectée. De même, la culture réalisée en présence de fibroblastes dans le compartiment apical d'un insert de type transwell, ne modifie pas cette faible survie, indiquant que les DDC nécessiteraient pour survivre un contact direct avec leur environnement dermique. Les ligands de TLR n'ont également aucune influence sur la viabilité des DDC (Figure 5b supplémentaire). En effet, certains ligands de TLR pourraient

modifier la survie, comme il a été démontré pour les pDC isolées de sang périphérique, qui activées par l'imiquimod, présentent une survie augmentée par rapport aux pDC non traitées (Gibson et al., 2002).

Quels facteurs ou combinaisons de facteurs permettent de maintenir les DDC fraîchement isolées de derme humain en culture ? En déterminant la voie d'apoptose activée lors de la purification des DDC, nous pourrions envisager de bloquer cette voie et ainsi d'améliorer la survie des DDC fraîchement isolées. Nous pourrions, en particulier, étudier les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, puisqu'il a été démontré que Bcl-2 régulerait la survie des DC murines et que l'activation par certains TLR induirait une surexpression de ces protéines et ainsi une amélioration de la survie (Hou and Van Parijs, 2004).

3. Expression des TLR par les cellules dendritiques cutanées

Quand nous avons réalisé ce travail, aucune étude ne relatait l'expression des TLR par les DC cutanées. Dans ce travail, nous avons recherché l'expression par PCR quantitative des ARNm des CL et DDC fraîchement isolées de peau humaine, peu d'anticorps anti-TLR humains étant disponibles.

a. Expression des TLR par les cellules de Langerhans

Nous avons démontré, dans cette étude, que les CL expriment les ARNm de TLR1, TLR2, TLR3, TLR5, TLR6 et TLR10. Trois études, publiées aujourd'hui, décrivent l'expression d'ARNm des TLR mais une seule détaille leur expression par les CL *ex vivo* (van der Aar et al., 2007). Les deux autres études ont utilisé des CL générées *in vitro* à partir de monocytes (Takeuchi et al., 2003), ou à partir de précurseurs hématopoïétiques CD34⁺ (Renn et al., 2006). Tous ces travaux confirment que les CL n'expriment pas TLR4 et ne répondent pas au LPS, ligand de TLR4. Par contre, les résultats divergent quant à l'expression de TLR7. En effet, les travaux de l'équipe de M. Teunissen et C. Renn révèlent que les CL expriment TLR7 (Renn et al., 2006; van der Aar et al., 2007). Dans notre étude, nous n'avons pas détecté d'ARNm de TLR7 chez les CL et de plus nous avons démontré qu'elles ne répondent pas à l'activation par des ligands de TLR7/8, Imiquimod et R848. De plus, nous avons confirmé ce résultat par l'étude de l'expression de TLR7, par RT-PCR classique, par des précurseurs de CL CD34⁺ triés au sixième jour de culture puis cultivés en milieu additionné de GM-CSF et TGF-β1. Ainsi, les différences entre nos résultats et ceux de la littérature semblent être liés principalement à la source de CL utilisée. Les CL générées *in vitro*, que ce soit à partir des

monocytes ou à partir de précurseurs CD34⁺, ne modélisent alors peut-être pas les CL humaines de manière si appropriée. Mais surtout, la contamination de la culture de progéniteurs hématopoïétiques par une population non différenciée peut modifier les résultats de PCR quantitative.

Afin de compléter l'expression des TLR par les CL, nous pourrions, dans un premier temps, confirmer l'expression retrouvée par ARNm en utilisant des anticorps spécifiques humains nouvellement commercialisés et contrôlés sur des cellules transfectées. Puis, afin de vérifier leur fonctionnalité, nous pourrions établir la réponse des CL à l'activation par des ligands des TLR, que nous n'avons pas utilisé dans ce travail, tel que la flagelline pour TLR5.

b. Expression des TLR par les cellules dendritiques dermiques

Une seule étude détaille l'expression des TLR par les DDC isolées de peau humaine. Cette étude démontre que les DDC exprimeraient tous les TLR exceptés TLR9 et TLR10 (van der Aar et al., 2007). Nos résultats, au contraire, démontrent que les DDC expriment TLR1, 2, 4, 6 et TLR3 et TLR8. Malheureusement, nous avons étudié uniquement l'expression des TLR sur la population dermique HLA-DR positive totale, bien que celle-ci contienne à la fois des DDC et des HDMEC. Nous n'avons été en mesure de déterminer l'expression des ARNm des TLR sur la population de DDC HLA-DR^{forte} CD1c⁺. En effet, l'extraction des DDC pour les études de PCR quantitatives nécessite des quantités importantes de cellules et notre accessibilité aux prélèvements (une fois par semaine) a limité notre étude. Par ailleurs, nous n'avons pu compléter et valider ces résultats par PCR quantitative sur les DDC CD1c⁺ purifiées suite à la fermeture prématurée des laboratoires Schering Plough. Cependant, nos résultats ont démontré de manière très intéressante que les DDC, contrairement aux CL, exprimeraient TLR8. Nous avons confirmé cette donnée concernant l'expression de TLR8 par RT-PCR classique en utilisant des DC générées *in vitro* à partir de précurseurs CD34⁺ triés au sixième jours de culture puis cultivés séparément soit en GM-CSF et IL-4 soit en GM-CSF et TGF-β1, de manière à obtenir isolément des DC interstitielles et des CL.

Afin de compléter ce travail, nous pourrions dans un premier temps, réaliser de nouvelles PCR quantitatives sur les DDC HLA-DR^{forte} CD1c⁺, puis confirmer l'expression des TLR par des marquages en cytométrie en flux en utilisant des anticorps anti-TLR humains, nouvellement commercialisés. Enfin, comme pour les CL, nous pourrions établir l'expression de TLR fonctionnels en évaluant la réponse des DDC à l'activation par des ligands des TLR.

Nous avons déjà entrepris quelques expériences utilisant R848, PGN, Poly(IC) et zymozan en culture avec des DDC pendant 24 heures. Aucune activation phénotypique n'a été détectée en cytométrie en flux. Cependant, nous avons analysé la production de cytokines IL-6, IL-10 et TNF- α . De manière intéressante, nous avons montré que les DDC sécrètent de fort taux d'IL-6 et de TNF- α en réponse au Poly(IC), et qu'elles produisent fortement de l'IL-10 en réponse au PGN, comme les CL. Néanmoins, l'activation par le PGN induit également, bien que plus faiblement, la production d'IL-6. Par ailleurs, l'activation par zymozan induit également une forte production d'IL-10, comme précédemment démontré chez la souris (Qi et al., 2003). L'analyse de la production d'IFN γ et d'IL-12 permettra de mieux comprendre l'orientation de la réponse immune induite par les DDC.

De manière intéressante, en milieu seul, les DDC sécrètent déjà des taux de cytokines assez élevés. Cette observation ajoutée à la faible survie des DDC en culture suggère que sorties de leur environnement, elles s'activent fortement spontanément. La digestion enzymatique utilisée pour réaliser la suspension dermique ainsi que la purification magnétique ont probablement induit un processus d'activation cellulaire ; la purification magnétique des CL par CD1a induit, par exemple, une légère activation de celles-ci (surexpression de CD83) (nos observations et (Tchou et al., 2003)).

4. Expression des TLR par les cellules cutanées non immunitaires

a. Expression des TLR par les kératinocytes

Les TLR peuvent être exprimés par des cellules n'appartenant pas au système immunitaire. En effet, la littérature a décrit l'expression des TLR sur les kératinocytes et les cellules épithéliales, entre autres. Ainsi, la récente étude de Lebre et coll. démontrent que des kératinocytes primaires humains expriment constitutivement tous les TLR exceptés TLR7 et TLR8 (Lebre et al., 2007). D'autres travaux plus anciens ont également démontré que les kératinocytes, de prépuce en particulier, expriment TLR2 et TLR4 (Kawai et al., 2002; Song et al., 2002). Nous avons confirmé cette expression de TLR2 et TLR4, et avons établi également que les kératinocytes humains expriment TLR1, 3, 5, 7 et 10. La différence d'expression retrouvée entre nos travaux et ceux de Lebre et coll., notamment sur TLR6, 7 et 9, est sans doute liée à l'origine des kératinocytes utilisés. En effet, nous avons utilisé des kératinocytes supra-basaux fraîchement isolés de peau humaine, tandis que Lebre et coll. ont utilisé des kératinocytes humains primaires après culture. En effet, les kératinocytes en culture sont

dans un état prolifératif et relativement peu différencié, comparable strictement à l'assise basale. Il serait alors intéressant d'évaluer le profil des TLR exprimé par les kératinocytes en fonction de leur stade de différenciation, par exemple, en isolant des kératinocytes de différentes couches épidermiques (basale, supra-basale, spinieuse, granuleuse). Nous pourrions également réaliser *in vitro* des cultures de kératinocytes à différents stades de maturation par abaissement de la concentration en sérum de veau et par augmentation de la concentration calcique : ainsi les kératinocytes se différencieront puis stratifieront avant de réaliser une différenciation kératinisée terminale par passage en milieu émergé.

b. Expression des TLR par les cellules endothéliales dermiques

Puisque nous avons évalué l'expression des TLR sur la population HLA-DR positive totale, nous nous sommes intéressé à l'expression des TLR par les cellules endothéliales dermiques. A l'heure actuelle, peu de données sont disponibles sur l'expression des TLR par les cellules endothéliales et plus particulièrement par les HDMEC. La majorité des travaux concernent les HUVEC ou des HDMEC immortalisées. Les HDMEC immortalisées expriment les ARNm de TLR1, 3, 4, et 5 et fortement TLR6 (Faure et al., 2000; Bulut et al., 2001). Au niveau protéique, l'expression de TLR4 est majoritaire alors que TLR2 n'est pas exprimé (Faure et al., 2000) et l'expression de ces deux TLR est augmentée après stimulation des HDMEC par le LPS, le TNF- α ou l'IFN γ (Faure et al., 2001). Par ailleurs, l'équipe de M. Maaser a montré que les HDMEC expriment constitutivement TLR5 tout comme les cellules endothéliales microvasculaires intestinales et les HUVEC (Maaser et al., 2004). La détection de la flagelline de bactéries pathogènes ayant pénétré la muqueuse intestinale par le TLR5, induirait une augmentation des molécules d'adhésion telles que ICAM-1, ce qui favoriserait la transmigration des leucocytes dans la *lamina propria* (Maaser et al., 2004). L'expression des autres TLR est peu décrite. Il a été démontré que les HUVEC n'expriment ni les ARNm de TLR7 ni ceux de TLR8 et faiblement l'ARNm de TLR3, dont l'expression est augmentée sous l'effet de l'IFN α et de Poly (I:C) (Tissari et al., 2005).

Nous pourrions trier, par cytométrie en flux, les HDMEC de la population dermique HLA-DR⁺, en utilisant un marqueur spécifique de cette population tel que CD31 ou CD34 et ainsi étudier de façon spécifique l'expression des TLR par les HDMEC. Puis, nous pourrions examiner la modulation des molécules d'adhésion, molécules intervenant dans l'extravasation et la transmigration des leucocytes à travers les endothéliums, induite par des ligands des TLR. Dans un modèle *in vitro* d'endothélium reconstruit (monocouche de

cellules endothéliales sur une membrane de porosité 5 µm), la migration de monocytes et la transmigration de DC pourraient être évaluées selon l'activation de l'endothélium.

5. Expression des récepteurs cytosoliques RLR et NLR

Nous avons démontré dans l'article 1, de manière très surprenante, que la réponse des CL au PGN induit la production d'IL-10 tandis que l'activation par LTA, autre ligand de TLR2, n'en induit pas. L'activation des CL par PGN pourrait être médiée par un autre récepteur que TLR2. En effet, les récepteurs cytosoliques NOD1 et NOD2 reconnaissent des structures spécifiques dérivés du PGN (Girardin et al., 2003a; Girardin et al., 2003b). Jusqu'à ce jour, l'expression de NOD1 et NOD2 a été uniquement définie sur des DC dérivées de monocytes (Tada et al., 2005). D'autres récepteurs cytosoliques, impliqués dans la reconnaissance d'ARN viraux ont été décrits ces dernières années. RIG-I et MDA-5 semblent essentiels pour la reconnaissance d'ARN double brin mais également pour certains ARN simples brins présentant des groupement 5'-triphosphate non-cappés (Hornung et al., 2006; Kato et al., 2006). Leur expression semble ubiquitaire. Les DC cutanées expriment-elles les récepteurs NOD, RIG-I et MDA-5 ? Il serait en effet intéressant de déterminer l'expression de ces nouveaux récepteurs cytosoliques sur les CL et les DDC par PCR (RT-PCR classique et quantitative) dans un premier temps. Puis, nous pourrions évaluer quels récepteurs ces DC cutanées utilisent en réponse à des ligands spécifiques. Ainsi, par des techniques d'ARN interférences ciblant TLR2, nous pourrions visualiser la réponse des CL au PGN et ainsi évaluer si la production d'IL-10 induite par le PGN est dépendante de la reconnaissance par NOD1 ou NOD2. Par ailleurs, nous pourrions déterminer si la réponse au Poly(IC) est dépendante uniquement de TLR3. Pour cela, en bloquant l'acidification des endosomes et ainsi la voie TLR3-dépendante par la chloroquine ou la quinacrine, nous pourrions évaluer si la réponse au Poly(IC) passe par MDA-5 (Kato et al., 2006) ou par TLR3.

6. Orientation de la réponse immunitaire

a. Coopération entre les *Pattern Recognition Receptors*

Il est clair aujourd'hui que la mise en place d'une réponse immunitaire passe par l'activation de plusieurs PRR. Ainsi, de nombreuses collaborations entre PRR ont été identifiées. Par exemple, la réponse induite par le virus atténué de la fièvre jaune impliquerait l'activation de TLR2, TLR7, TLR8 et TLR9 (Querec et al., 2006). De même, les récepteurs NOD agissent en synergie avec des TLR pour l'induction de réponses anti-

bactériennes (Takada and Uehara, 2006). D'autre part, il a été récemment décrit que la protéine de choc thermique gp96, ligand des récepteurs *scavengers* LOX-1 et CD36, amplifie la réponse anti-bactérienne des DC murines (Warger et al., 2006; Yang et al., 2007). D'autre part, lors d'une infection virale, selon le mode d'entrée du virus dans la DC (endocytose ou fusion), différents récepteurs seront impliqués tels que les récepteurs cytosoliques RIG-I et MDA-5, les TLR endosomaux ou les récepteurs membranaires (lectines de type C, TLR, récepteurs *scavengers*...).

De nombreux ligands décrits aujourd'hui peuvent activer différents PRR. C'est le cas du PGN et TLR2 et NOD1/NOD2, mais également du zymozan reconnu à la fois par Dectin-1 et par TLR2. L'utilisation de tels ligands entraîne donc l'activation de plusieurs récepteurs. Quel est le motif minimum reconnu par chaque PRR ? Le Curdlan a été récemment défini comme ligand spécifique de Dectin-1 n'activant pas TLR2. Grâce à ce ligand, les études caractérisant la réponse induite par la voie de Dectin-1 sont spécifiquement analysées (Leibundgut-Landmann et al., 2007; Meyer-Wentrup et al., 2007). De même, il a été récemment démontré que RIG-I détecte des ARN présentant des groupements 5'-triphosphate non-cappés (Hornung et al., 2006; Pichlmair et al., 2006). Par analyse protéique structurale (résonance magnétique nucléaire, spectrographie de masse ou cristallographie), il serait intéressant de déterminer la structure de chaque ligand reconnu par chaque PRR, puis chimiquement de synthétiser un composé structurellement analogue aux propriétés activatrices identiques. De plus, la synthèse *in vitro* de multiples séquences d'acides nucléiques permettra de déceler les motifs minimaux reconnus par TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9.

La synergie des réponses induites par la coopération entre différents PRR est liée à la présence de multiples ligands sur les micro-organismes pathogènes. Ainsi, l'étude de la coopération entre PRR dans l'induction de la réponse immune par les DC devrait être menée sur des micro-organismes entiers, telles que des bactéries vivantes, de nombreux ligands encore non identifiés restant à découvrir sur ces pathogènes. Plusieurs méthodes pourront être employées afin de déterminer les récepteurs impliqués en utilisant notamment : (i) des anticorps bloquant spécifiquement d'un récepteur, (ii) des dominants négatifs, (iii) des ARN interférents ou (iv) des shARN (*short hairpin*) qui seront probablement plus simples d'utilisation dans les DC car transfectés *via* des vecteurs viraux. Cependant, le mode de transfection des shARN induit peut être une activation des DC.

b. Polarisation de la réponse lymphocytaire T CD4⁺

Afin de déterminer quelle réponse les DC cutanées vont induire en réponse à divers stimuli bactériens ou viraux, nous analyserons, dans un premier temps, leur capacité à activer des lymphocytes T CD4⁺ naïfs ainsi que l'orientation de cette réponse. Nous cultiverons les DDC ou les CL fraîchement isolées de peau humaine en présence de lymphocytes T naïfs, puis nous les activerons avec différents stimuli. Nous récolterons le surnageant de cette culture et évaluerons l'orientation de la réponse T. Nous établirons l'orientation en analysant le profil de cytokines sécrétées, profil des lymphocytes Th1 (IL-2, IFN γ et TNF- α) ou des lymphocytes Th2 (IL-4, 6, 10). Nous évaluerons de plus la production de cytokines impliquée dans l'orientation des lymphocytes Th17, c'est-à-dire l'IL-23, IL-17 et l'IL-21. Ainsi, l'orientation de la réponse (Th1, Th2 ou Th17) induite par les DDC *versus* les CL, en réponse à divers stimuli (composés bactériens, composés viraux, micro-organismes vivants entiers,...) sera déterminée.

c. Activation des lymphocytes T cytotoxiques

Les travaux de Bevan et coll. ont démontré que l'activation de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) se produisait *in vivo*, chez la souris, après présentation d'antigènes exogènes par le CMH de classe I (Bevan, 1976). Les DC peuvent présenter différents types d'antigènes par cette voie, et en particulier des antigènes viraux ou tumoraux. Récemment, il a été démontré la capacité des CL et des DDC à « *cross-présenter* » *in vitro* des antigènes tumoraux à des lymphocytes T CD8⁺ (Cao et al., 2007). Cette étude réalisée sur des CL et des DDC générées *in vitro* à partir de précurseurs CD34⁺ atteste de la capacité des deux populations de DC cutanées à présenter des antigènes à des LT CD8⁺. Chez la souris, au contraire, Le Borgne et coll. démontrent qu'après immunisation de la peau par un haptène (2,4-dinitro-1-fluorobenzène), l'activation des CTL est réalisée par des DC nouvellement recrutées, dérivées de monocytes du sang (Le Borgne et al., 2006). Il serait alors très intéressant d'analyser l'efficacité de la présentation croisée par les CL et les DDC humaines fraîchement isolées de peau et ainsi déterminer si elles présentent des capacités différentes à activer des CTL.

d. Rôle des cellules de l'environnement cutané dans l'orientation de la réponse immunitaire

Le rôle potentiel des cellules des tissus de revêtement dans l'induction de la réponse immune a été mis en évidence par Sato et coll., qui ont démontré que la réponse anti-virale envers HSV2 requiert la reconnaissance virale par les DC mais également par les cellules épithéliales vaginales murines (Sato and Iwasaki, 2004). Par ailleurs, dans la muqueuse intestinale, les cellules épithéliales, exposées à des bactéries, activent indirectement les DC et orientent la réponse immunitaire (Rimoldi et al., 2005). Néanmoins, les récents travaux de l'équipe de C. Reis e Sousa ont montré que, dans un modèle murin de peau, l'activation des cellules stromales par le LPS n'est pas suffisant pour induire l'activation des DC (Nolte et al., 2007).

Quel rôle jouent les kératinocytes et les fibroblastes de la peau humaine dans l'initiation de la réponse immunitaire cutanée ? L'expression de TLR4 en l'occurrence, absent des CL, permettrait la reconnaissance des bactéries Gram⁻. Ainsi l'activation des kératinocytes induit la sécrétion de cytokines inflammatoires, telles que le TNF- α permettant l'activation indirecte des CL (Kock et al., 1990). D'autre part, une étude récente a montré que les surnageants de culture de kératinocytes murins activés par CpG *via* TLR9 induisent l'activation de CL isolées *ex vivo* et ainsi leur capacité à activer des LT CD4⁺ (Sugita et al., 2007). En conséquence, l'étude du rôle de cellules non hématopoïétiques dans l'initiation de la réponse immunitaire cutanée est indispensable pour appréhender le rôle des CL et des DDC humaines dans l'immunité cutanée.

Ainsi, nous pourrions activer des kératinocytes ou des fibroblastes primaires humains par différents stimuli bactériens ou viraux. D'une part, nous pourrions analyser les cytokines sécrétées par ELISA, *via* des puces à cytokines/chimiokines ou par cytométrie en flux. Puis ces surnageants de culture seraient utilisés pour activer indirectement les DC cutanées et ainsi étudier les cytokines produites et la réponse lymphocytaire T CD4⁺ induite. En comparant cette réponse avec celle générée par l'activation directe des DDC et CL, la modulation de la réponse immunitaire par les facteurs environnementaux sera appréciée.

7. Rôle des CL et des DDC dans l'immunité cutanée

Comme nous l'avons montré dans notre travail, les CL et les DDC expriment un profil de PRR distincts. En effet, les CL expriment la langerin et TLR1, TLR2, TLR6, TLR10 et TLR3. Les DDC, au contraire, expriment MMR, DC-SIGN, Dectin-1, des récepteurs *scavengers*, et

TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TLR10 et TLR3 et TLR8. De manière très intéressante, il semble que, suivant leur profil de PRR, les CL et les DDC aient un rôle complémentaire dans l'immunité cutanée. En effet, l'absence de TLR4 chez les CL pourrait être contre-balançée par l'expression de TLR4 par les DDC, permettant ainsi une réponse cutanée envers les bactéries Gram⁻. De même, l'expression différentielle de TLR8 indique que les DDC joueraient un rôle différent de celui des CL dans l'immunité anti-virale.

Le rôle des DDC et des CL a été principalement étudié *in vivo* chez la souris. La mise au point de modèles de souris Langerin-DTR, où les CL sont spécifiquement délétées, sans induction d'inflammation cutanée, a permis d'examiner le rôle individuel des CL et des DDC dans l'immunité cutanée. Ainsi dans de tels modèles, les réactions d'hypersensibilité de contact se produisent toujours malgré la disparition des CL, indiquant alors qu'elles ne joueraient pas de rôle contrairement aux DDC (Bennett et al., 2005; Kissenpfennig et al., 2005). D'autre part, dans l'infection par HSV, ce sont les DC du chorion du vagin qui sont responsables de l'activation des LT CD4⁺ (Zhao et al., 2003). Enfin, Allan et coll. ont récemment établi que les DC cutanées ne serviraient que de transporteurs d'antigènes, et que ce serait uniquement les DC des ganglions lymphatiques qui activeraient la réponse T (Allan et al., 2006). Ces travaux très intéressants contestent le rôle important des CL dans l'initiation de la réponse immunitaire. Néanmoins, avant de modifier complètement notre vision du rôle des CL dans l'immunité, il faut faire attention à l'interprétation de ces études *in vivo*. En effet, la voie d'inoculation (épiderme ou derme) pourrait induire l'activation préférentielle d'un type de DC. Par ailleurs, la durée suivant l'inoculation de l'antigène est très importante puisque Kissenpfennig et coll. ont montré que les CL migrent lentement vers les ganglions (72 heures post-immunisation), tandis que les DDC les atteignent dès 24 heures (Kissenpfennig et al., 2005). L'observation à des temps trop précoces masquerait le potentiel rôle des CL. Enfin, comme précédemment évoqué, il ne faut pas omettre l'environnement tissulaire et son potentiel rôle dans l'activation des DC cutanées. En effet, les résultats obtenus peuvent être différents selon la localisation (peau *versus* muqueuse vaginale), notamment suivant les conséquences d'une possible activation des kératinocytes ou des cellules épithéliales.

Nous pourrions évaluer le rôle des CL par rapport à celui des DDC dans un modèle *in vitro* de peau reconstruite intégrant spécifiquement une seule ou les deux populations de

DC. Ainsi, nous pourrions par vidéo-microscopie suivre la migration des DC en réponse à différents stimuli. Puis, en récoltant les cellules ayant migré dans le compartiment basal, l'orientation de la réponse T serait examinée. Ainsi, nous pourrions analyser le rôle des CL et des DDC chez l'homme dans l'initiation de la réponse anti-VIH suivant l'administration d'un vaccin anti-VIH par voie intradermique, tel que le vaccin actuellement testé en essai clinique de phase II par l'Agence Nationale de Recherche sur le SIDA.

La détermination du rôle des DC de la peau dans la réponse immunitaire cutanée implique une multitude de facteurs strictement dépendants des DC et d'autres indépendants qui sont liés à la fois aux facteurs et cellules environnementales mais également aux pathogènes et à leur mode d'infection. En conséquence, la connaissance des PRR et de leur expression par les différentes cellules de la peau, ainsi que la réponse induite selon les stimuli permettra de développer notamment des vaccins activant le plus efficacement l'immunité cutanée.

2. ARTICLE 3 : EARLY EVENTS IN HIV TRANSMISSION THROUGH A VAGINAL MUCOSA

Bouschbacher Marielle, Bomsel Morgane, Verronèse Estelle, Gofflo Sandrine, Ganor Yonatan, Dezutter-Dambuyant Colette et Valladeau Jenny

Resoumis à AIDS après révision

A. Présentation de l'article

Le passage du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) à travers les muqueuses génitales représente la voie principale de contagion et de propagation de la pandémie du SIDA. Des progrès indéniables dans la compréhension des mécanismes d'interaction du VIH avec les muqueuses exposées ont été accomplis ces dernières années. L'étude de l'infection sur des modèles animaux, notamment chez le singe, a permis de réaliser une description histologique détaillée des phases précoces de la propagation virale et des cellules potentiellement impliquées. Plusieurs mécanismes de transmission du VIH à travers les muqueuses ont été proposés : (i) détérioration de l'intégrité de la muqueuse, (ii) infection des cellules épithéliales, (iii) passage *via* les cellules épithéliales par un mécanisme de transcytose, (iv) transmigraton de cellules infectées et (v) implication de cellules immunitaires telles que des CL ou des lymphocytes T. Aujourd'hui, en dépit des nombreux travaux réalisés, le mécanisme précis par lequel le VIH traverse les muqueuses génitales pluristratifiées et est disséminé reste encore à déterminer.

L'objectif de ce travail a donc été de déterminer quel est, ou quels sont ces mécanismes ? Nous avons notamment axé notre travail sur le rôle précis des CL de l'épithélium vaginal dans le passage du VIH. Nous avons également cherché à déterminer si le phénomène de transcytose, observé au niveau des muqueuses monostratifiées intestinales, existe au sein de la muqueuse vaginale pluristratifiée. Pour cela, nous nous sommes attachés à développer un modèle de muqueuse vaginale reproduisant le plus physiologiquement possible l'organisation naturelle du vagin humain normal. En effet, lorsque nous avons débuté ce travail, aucun modèle existant ne rendait compte précisément de la structure de la muqueuse génitale pluristratifiée. Dans un premier temps, notre équipe a modélisé un chorion équivalent en utilisant le modèle de lattice de collagène de Bell (Dumont et al., 2004).

Cette lattice à rétraction libre intègre des fibroblastes issus de vagin humain au sein d'une matrice de collagène de type I. Les fibroblastes induisent la rétraction du collagène et ainsi la formation d'un chorion équivalent (Bell et al., 1979). Ce modèle a été utilisé pour étudier l'effet de l'environnement tissulaire sur la différenciation et la maturation des DC ainsi que leur susceptibilité à l'infection par le VIH (Dumont et al., 2004). Par la suite, nous avons développé un modèle complet de muqueuse vaginale reconstruite (épithélium et *lamina propria*), présenté ici, à partir de fibroblastes humains et de cellules épithéliales humaines isolées respectivement de prépuce et de vagin. De plus, dans le but d'étudier le rôle des CL dans la transmission du VIH, nous avons intégré des précurseurs CD34⁺ de CL à 6 jours de culture, qui au sein de l'environnement épithélial achèvent leur différenciation pour former des CL. Avant d'utiliser ce modèle pour des études sur le passage du VIH, nous avons contrôlé son intégrité et sa cohésion par la mesure de TEER (Résistance Electrique Trans-Epithéliale) et du passage de solutés et des observations en microscopie électronique. Dans nos observations en microscopie électronique, nous avons détecté la présence de jonctions serrées. Nous avons alors recherché l'expression des protéines des jonctions serrées dans l'épithélium vaginal normal et démontré pour la première fois que les cellules épithéliales vaginales expriment des protéines des jonctions serrées. Par ailleurs, nous avons établi que les CL expriment également des protéines des jonctions serrées, en particulier Claudin-1 et ZO-1, leur permettant d'interagir avec les cellules épithéliales ou kératinocytes de leur environnement.

Afin de déterminer les mécanismes de la transmission du VIH à travers le vagin, nous avons infecté les muqueuses reconstruites intégrant ou non des CL avec des cellules mononucléées infectées par deux souches virales d'isolats primaires de tropisme R5 et X4. Au bout de 4 heures d'incubation, nous avons analysé les surnageants des milieux basaux afin de déterminer le possible passage de particules virales infectieuses relarguées par les cellules mononucléées infectées. Nous avons établi qu'aucune particule virale infectieuse n'est détectée et que la présence de CL ne modifie pas ce passage. Ce travail montre donc qu'il n'y a pas de passage intracellulaire ou intercellulaire de particules virales libres à travers la muqueuse vaginale pluristratifiée. De plus, les CL ne semblent jouer aucun rôle à cette étape de l'infection.

**EARLY EVENTS IN HIV TRANSMISSION
THROUGH A HUMAN VAGINAL MUCOSA**

**Marielle Bouschbacher^{*}, Morgane Bomsel[§], Estelle Verronèse^{*}, Sandrine Gofflo^{*},
Yonatan Ganor[§], Colette Dezutter-Dambuyant^{*}, and Jenny Valladeau^{*}**

^{*} Université Claude Bernard Lyon 1, EA3732, Centre Hospitalier Edouard Herriot,
Lyon, France. Current adress: INSERM U590, Centre Léon Bérard, Lyon, France.

[§] Institut Cochin, INSERM U567, CNRS-UMR 8104, Université Descartes-IFR 116,
Paris, France

Correspondence to Jenny Valladeau, INSERM U590, Centre Léon Bérard, 28 rue
Laennec, 69473 Lyon cedex 08, France. Tel :+33 4 78 78 59 76. Fax : +33 4 78 78 27

20

E-mail : valladea@lyon.fnclcc.fr

Running head title: HIV transmission through human vaginal mucosa

Abstract

Objective: The early steps of HIV entry into intact vaginal mucosa still need to be clarified. Here we investigated how HIV translocated across the vaginal pluristratified epithelium, either by transcytosis or by uptake in Langerhans cells (LC).

Methods: Using human primary fibroblasts and vaginal epithelial cells, we developed an *in vitro* model of vaginal mucosa in which LC could also be integrated. Due to the absence of T lymphocytes and macrophages, we specifically studied the role of LC in HIV transmission and the transcytosis of cell-associated HIV.

Results: Our model has a normal mucosal tissue architecture and LC were efficiently integrated within the pluristratified epithelium. In addition, tight junction (TJ) proteins' expression, high transepithelium resistance and low FITC-BSA passage confirmed the integrity and impermeability of the reconstruction. Furthermore, we showed that human LC also expressed TJ proteins. Then, we demonstrated that neither transcellular nor intercellular transport of free infectious virus released by R5 or X4-infected PBMC inoculated apically occurred in the vaginal mucosa, irrespective to the presence of LC.

Conclusions: For the first time, we documented that, within 4 hours following contact with HIV-infected cells, translocation of free HIV particles across a pluristratified mucosa is not detectable and that, in this context, it seemed that LC do not increase HIV transmission. Moreover, we provided a useful model for the development of strategies preventing HIV entry into the female genital tract, especially for testing the efficiency of various microbicides.

Key words: vaginal mucosa / HIV infection / Langerhans cells

Abstract word number: 238 words

Introduction

The genital tract is the main route of natural infection for HIV. Understanding the mechanisms of how HIV is transmitted is crucial for the development of effective strategies designed to prevent HIV infection and pandemic. In the initial phase of sexual transmission, virus crosses mucosal epithelium and is spread to proximal lymphoid organs where a permanent infection is established (reviewed in [1]).

Multiple hypothesis have been proposed for HIV transmission : disruption of the integrity of the mucosa [2, 3], direct infection of epithelial cells [4], transcytosis across epithelial cells [5], or virus uptake and/or infection of immune cells [6]. Several studies have demonstrated that virus transcytosis occurs within the first 2 hours of HIV infection using monostratified intestinal epithelial cells [7, 8]. By contrast, *ex vivo* genital mucosa organ cultures showed that cervix epithelial cells are not susceptible to infection and do not transcytose virions, and that transmission is mediated by immune cells [9, 10]. Indeed, in female rhesus monkeys, Langerhans cells (LC), resident immature dendritic cells (DC) located within the epidermis and the epithelia of various mucosa, have been shown to be infected following non-traumatic intravaginal exposure to SIV [11]. Zhang *et al.* also demonstrated that activated and resting CD4⁺ T cells were predominantly infected [12]. Similarly, human studies using mucosal *ex vivo* explants have implicated sub-mucosal CD4⁺ T cells [13], LC [6, 9, 14] or both cell types [15]. Although those studies demonstrated the presence of provirus in immune cells, they did not describe how HIV is transmitted across the vaginal mucosa then reached the submucosal immune cells in non-traumatic conditions.

Definitive studies of the early infection steps in the human vaginal epithelium are lacking, leading us to the investigation reported here. Indeed, it is still unknown whether

HIV is able to cross a pluristratified mucosa as a cell-free viral particle as demonstrated in monostatified mucosa. In this context, by exposing a reconstructed vaginal mucosa to HIV-R5 and -X4 infected cells, we established that no translocation of free released virus was detected within the first 4 hours following apical inoculation. Furthermore, we demonstrated that LC are not capable of enhancing HIV passage during these initial events.

Methods

Primary cell cultures

From the Lyon Clinical Investigation Center, according to institutional guidelines, normal human fibroblasts and vaginal epithelial cells were obtained from foreskins and hysterectomy vaginal biopsies, respectively. Primary fibroblast cultures were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, NY) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS, Gibco BRL), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Sigma). Collagenase (1 mg/ml 2 hours, 37°C, Sigma) and trypsin/EDTA (overnight, 4°C) enzymatic treatments were used to isolate vaginal epithelial cells; the cell suspension was cultured in serum-free culture medium (KSFM, Gibco BRL) supplemented with 50 µg/ml Bovine Pituitary Extract (BPE, Gibco BRL), 5 ng/ml Epidermal Growth Factor (EGF, Gibco BRL).

Preparation of vaginal mucosa reconstructions

Lamina propria equivalent

$3 \cdot 10^5$ fibroblasts were seeded underneath a 12µm porosity polycarbonate membrane Transwell[®] (Corning Costar Corporation, Portsmouth, NH), then cultured for 3 weeks in

complete DMEM supplemented with 10 ng/ml EGF and 50 µg/ml vitamin C (Aguettant, Lyon, France).

Vaginal mucosa reconstruction

$5 \cdot 10^5$ vaginal epithelial cells were seeded over the *lamina propria* equivalent and then cultured for 10 days in modified DMEM/ HamF12 (2:1) medium supplemented with 10% FCS (Hyclone, Logan, UT). Then, serum concentration decreased from 10% to 1% and CaCl_2 (Sigma) concentration raised to 1.7mM for the 8 following days. During the last 2 days, reconstructions were elevated at the air-liquid interface to improve stratification and differentiation.

Langerhans cells' generation and isolation

CD34^+ haematopoietic progenitors, purified from cord blood by magnetic isolation (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany), were cultured during 6 days in 200 ng/ml GM-CSF (Schering-Plough Research Institute, Kenilworth, NJ), 25 ng/ml SCF (R&D Systems, Boston, MA), 2.5 ng/ml $\text{TNF-}\alpha$ (R&D Systems) and 0.5 ng/ml $\text{TGF-}\beta$ (R&D Systems). $2 \cdot 10^5$ LC precursors were seeded on the vaginal reconstructions. For confocal microscopy analysis, LC precursors were labeled with Orange Cell Tracker CMTMR (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) before seeding. Fresh LC isolated from human skin were obtained and characterized as previously described [16].

Immunohistochemistry analysis and flow cytometry

Normal human vagina and vaginal reconstructions were embedded in Histowax[®] paraffin according to the manufacturer's procedure (Intertiles, Brussels, Belgium). Indirect immunohistochemistry stainings were performed on 6 µm sections with a streptavidin-biotin-peroxidase assay (LSAB2 Kit, Dako, Glostrup, Denmark). Negative

controls were conducted using unrelated isotype-matched mouse immunoglobulins. Counterstaining was carried out with Hematoxylin. Antibodies used were the following: anti-cytokeratin 13 (CBL176, Cymbus Biotechnologies, Chandlers Ford, Hants, UK), anti-involucrin (NCL-INV, Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK), anti-Collagen IV (COL-94, Sigma), anti-Claudin 1 (2H10D10, Zymed, San Francisco, CA), anti-Claudin 4 (3E2C1, Zymed), anti-ZO-1 (ZO1-1A12, Zymed), anti-Occludin (OC-3F10, Zymed), anti-CD45 (2D1, BD Biosciences, San Jose, CA), and anti-loricrin (rabbit polyclonal, Babco, Richmond, CA). Same antibodies were used for intracellular stainings by flow cytometry analysis as previously described [17].

Ultrastructural observation by transmission electron microscopy

Vaginal mucosa reconstructions were fixed in 2% glutaraldehyde in cacodylate buffer at 4°C for at least 3 days then postfixated for 1 hr with 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer with sucrose. After dehydration, they were embedded in epoxy medium. Ultrathin sections were analyzed on a JEOL 1200 EX electron microscope at 80kV accelerating voltage (Centre des Microstructures, Villeurbanne, France).

TransEpithelial Electrical Resistance (TEER) and FITC-BSA transmission

TEER was measured with a potentiometer accordingly to the manufacturer's guidelines (MilliCell, Millipore, Molsheim, France). FITC-BSA passage was evaluated as followed: 100 µl of FITC-BSA (2 mg/ml; Molecular Probes) were added to the apical chamber of vaginal reconstructions. After 4 hours of incubation at 37°C, FITC-BSA was removed, basal media were harvested, and then analyzed on a spectrofluorimeter (SpectraMax M5, Molecular Device, Sunnyvale, CA).

RT-PCR

Total RNA was extracted from freshly isolated epidermal LC, human vaginal epithelial cells and foreskin keratinocytes. Total RNA was extracted using Absolutely RNA Microprep Kit (Stratagene, La Jolla, CA) then mRNA was reverse-transcribed to cDNA using Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI). For PCR amplification with Taq DNA polymerase (Promega), primers used are detailed in (Table 1). The cycling parameters were as follows: 40 sec 94°C/ 1 min 94°C, 1 min 55°C, 2 min 72°C for a total of 35 cycles.

Virus and PBMC infection

We used the primary isolates 92BR025 (Non Syncitium Inducing, R5) and 91US054 (Syncitium Inducing, X4) obtained from the NIH AIDS Research and Reagent Reference Program. PBMC were stimulated with PHA (1 µg/ml; Sigma) and IL-2 (0.5 ng/ml; Roche, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN), and PBMC infection was carried out as previously described [18]. HIV-infected PBMC were harvested at the optimal virus released day. The amount of virus produced by PBMC (revealed by HIV p24 Ag concentration) in 4 hours was 2.6 ng/ml for 92BR025 and 9 ng/ml for 91US054 and % of infected-PBMC were 2 to 2.5% (p24 positive cells) with 92BR025 and 1.75 to 1.93% for 91US054.

HIV transmission across vaginal mucosa reconstructions

Reconstructions were exposed to 1.10^6 HIV infected PBMC. After 4 hours of incubation, the inoculum was removed, then basal media were harvested and centrifuged. Supernatants and cell pellets were used either for direct quantification of HIV p24 Ag by ELISA (Innotest HIV Antigen mAb, Innogenetics N.V., Gent, Belgium;

detection limit 10 pg/ml) or added to PHA/IL-2 stimulated indicator PBMC for a secondary-co-culture. Those co-cultures supernatants were harvested on day 4, 5 and 7, and analyzed for HIV p24 Ag.

Confocal microscopy

Vaginal mucosa reconstructions containing CMTMR labeled LC alone or inoculated with HIV-infected PBMC labeled with Green Cell Tracker CMFDA (Molecular Probes) were fixed for 40 minutes with 4% formaldehyde after 4 hours of infection. Samples were labeled with DAPI (Molecular Probes), mounted using Vectashield (Vector Laboratories, Orton Southgate, Peterborough, UK), then analyzed using a Leica TCS SP2 (Centre Commun de Quantimétrie, Lyon, France).

Results

Vaginal mucosa reconstructions and normal human vagina present similar architecture

To evaluate the initial events in HIV entry through the human female genital tract, we developed an *in vitro* 3D model of vaginal mucosa using primary human vaginal epithelial cells and fibroblasts (Fig. 1A). Mucosa is reconstructed on a 12 µm porosity Transwell[®] semi-permeable membrane in order to allow cells to migrate freely within the reconstruction. The histological organization of the reconstructed mucosa was first evaluated by immunohistochemistry (Fig. 1B). Fibroblasts seeded underneath the membrane, expanded, migrated and synthesized extracellular matrix on both side of the membrane. Among neo-synthesized collagens, Collagen IV was largely found in all the extracellular matrix and not strictly located to the epithelial-chorion membrane zone as in skin's reconstructions [19]. Although reconstructed epithelium was apparently

thinner than normal human vagina, specific differentiation markers like Cytokeratin 13 and Involucrin were clearly expressed. Moreover, as expected, loricrin, a late epidermal differentiation marker found in the skin, was absent (Fig. 1B).

In order to analyze LC role in HIV transmission, we integrated DC-precursors (obtained from CD34⁺ hematopoietic progenitors) in mucosa. As previously described in reconstructed skin, terminal differentiation of CD34⁺ precursors occurs in the reconstructed tissue [20]. Thus, LC could be detected within the reconstructed epithelium as demonstrated by the presence of CD45⁺ cells (Fig. 1C). However, we noted that LC density was lower than in normal human vagina, as previously observed by Regnier *et al.* who identified fivefold fewer LC in their skin reconstructions than in normal human epidermis [21]. Moreover, to further observe LC in vaginal reconstructions, we used LC precursors labeled with Orange Cell Tracker CMTMR before seeding. As demonstrated in (Fig. 1D), CMTMR-positive LC were integrated within the reconstructed vaginal epithelium.

Tight junction proteins are expressed by both vaginal epithelial cells and Langerhans cells

Cell-cell adhesion within stratified epithelium is mediated by adherens junctions and desmosomes. As expected, reconstructed vagina similarly to normal human vagina expressed E-Cadherin, a typical protein of the cell junctional complex (Fig. 2A). However, Tight Junctions (TJ) have been previously described as a hallmark of single-layered epithelia where they seal cells together. Although TJ were described in some pluristratified mucosa such as in nasal one [22] or in skin [23], they have not been detected in human vagina. TJ complexes are composed of transmembrane proteins, the Claudin family and Occludin, and of cytoplasmic proteins such as Zonula Occludens

proteins (ZO) [24]. In normal human vagina, immunohistochemistry revealed a strong expression of Claudin 1 and Claudin 4 and a low expression of Occludin and ZO-1, as observed in the vaginal mucosa reconstructions (Fig. 2A). However, Claudin-1, Occludin and ZO-1 are not gradiently expressed in reconstructed mucosa due to the thinner epithelium obtained. Presence of TJ complexes was confirmed by transmission electron microscopy. Indeed, a typical TJ is observed between two neighboring cells, numerous desmosomes being also present surrounding most epithelial cells (Fig. 2B). Furthermore, we also assessed the TransEpithelial Electric Resistance (TEER) (Fig. 2C), an obvious correlation to the presence of functional proteins in the tissue. TEER of mucosal reconstructions reaching 250 Ohms/cm² was lower than TEER of epithelial cell monolayers [25]. Due to the presence of the corneified layer, TEER of skin reconstructions used as positive controls were higher (530 Ohms/cm²). On the contrary, TEER of *lamina propria* equivalent alone were low (123.5 Ohms/cm²) almost identical to control TEER (data not shown). Furthermore, we noticed a significant difference between TEER of mucosal reconstructions and mucosal reconstructions containing LC. To further rule out the impermeability to macromolecules and to confirm the integrity of the vaginal mucosa reconstructions, we monitored FITC-BSA passage (mean diameter 8 nm) (Fig. 2D). After 4 hours, a slight amount of FITC-BSA was measured in vaginal mucosa reconstructions integrating or not LC. Furthermore, the presence of LC in reconstructed mucosa decreased the amount of FITC-BSA measured after the same time lapse. Therefore, we asked whether LC could express TJ proteins thereby interacting with mucosal epithelial cells. For the first time, we demonstrated that freshly human skin isolated LC expressed mRNA of Claudin 1 and ZO-1 (Fig. 3A). mRNA encoding for TJ proteins by freshly isolated human vaginal epithelial cells and keratinocytes was also illustrated (mRNA of Claudin 1, Claudin 4, Occludin and ZO-1). Expression of TJ

was further detected at protein level by flow cytometry (Fig. 3B). Indirect immunofluorescence analysis revealed that freshly isolated LC expressed ZO-1 (Fig. 3C a). Moreover ZO-1 seemed to be implicated in adhesion point with surrounding keratinocytes, as observed by a bright ZO-1 expression at the contact zone between a large keratinocyte, identified by phase-contrast, and a small LC (Fig. 3C b).

Neither R5 nor X4 viral particles cross human vaginal mucosa in 4 hours irrespective to the presence of Langerhans cells

Transcellular transport of virus across a pluristratified mucosa remains an open question and its efficiency could be different for either free virions or released virions by infected cells upon contact with the epithelium. No translocation of cell-free HIV inoculated apically was detectable (data not shown) in agreement with Van Herrewege *et al.* [26] and as already shown for monostratified epithelia [27]. We therefore inoculated reconstructions with HIV-infected PBMC (Fig. 4A). Briefly, reconstructions were exposed to 1.10^6 92BR025 (R5-virus) or 91US054 (X4-virus) infected PBMC. After 4 hours, basal media were collected and centrifuged to separate basal cell-free fractions (supernatants) from basal cell fractions. We first investigated whether translocation of free HIV particles, released upon contact of infected cells with the mucosa had occurred. Hence basal supernatants were analyzed for both p24 level and subsequent co-culture with indicator PBMC up to 7 days. Interestingly, we could not detect significant p24 level for R5 and X4-virus in basal supernatants after 4 hours (Fig. 4B), indicating that no transcytosis or passive passage of HIV occurred. In this context, using *lamina propria* equivalent alone, significant level of p24 were found (1.9 ng/ml) revealing that the barrier function is not achieved by this sub-epithelial compartment (data not shown). Observation of infected mucosa by transmission electron microscopy confirmed the

absence of free HIV particles in the epithelium either into epithelial cells or in intracellular spaces (Fig. 4C). In addition, no productive infection could be detected after co-culture with indicator PBMC (data not shown). Thus, neither free infectious R5, nor X4 viral particles released by infected PBMC, translocated through the vaginal mucosa by paracellular (intercellular) passage or transcellular transport during early infection. Interestingly, no change is observed in the presence of LC indicating that they may have no role in the transmission of HIV free particles across this reconstructed mucosa in the first 4 hours of infection.

Langerhans cells may not enhance R5 or X4-HIV transmission and infection during the initial phase of transmission

To analyze more precisely the role of LC in the penetration of HIV in this mucosa, we used the same protocols as described above, but instead of analyzing basal supernatants we focused on basal cell fractions. No significant levels of p24 were detected in the basal cell fractions (data not shown). After co-culture with indicator PBMC, only a low infection was observed after 5 days of co-culture with both virus types (Fig. 4D). Surprisingly, no differences were found in the culture from mucosa containing LC or not, indicating that LC might not influence HIV transmission in early events. By flow cytometry analysis, and within the limit of sensitivity, no infected PBMC or LC were detected in basal compartments after 4 hours (data not shown), suggesting that no migration of infected cells or passive passage by damages within the reconstructed mucosa occurred during the first 4 hours of contact with infected PBMC. Furthermore, using a mucosal reconstruction integrating CMTMR labeled LC (Orange) and inoculated by CMFDA labeled infected PBMC (Green), close interaction between a cell of PBMC inoculum and a LC forming a conjugate is observed within the reconstructed

epithelium (Fig. 4E). Therefore, our results established that very few infectious virions carried by cells are transmitted in the first 4 hours, a time by which a significant LC migration may occur *in vivo* [28].

Discussion

To study HIV transmission at the femal genital tract, we established a new 3-D human vaginal mucosa model. Our reconstructed mucosa differs from the most well-known models. Indeed, in contrast to previous studies using epithelial cell lines [29] or mimicking only the epithelium compartment [30, 31 , 32], we developed a model comprising, as *in vivo*, both the epithelium and the *lamina propria* using human primary cells. Histological and biochemical data clearly assessed the quality of this mucosa and our model, integrating only LC and excluding other immune cell types, allow studies strictly restricted to the individual role of LC in HIV transmission. In this context, previous models have not yet allow specific analysis of LC function due to the presence of intraepithelial T cells and subepithelial lymphocytes and macrophages [6, 9, 13, 15]. Furthermore, our reconstructed vagina, giving differential and independent access to both apical and basal media, is suitable for the evaluation of HIV and cell migration in contrast to model developped on dead desepidermized dermis [14].

In polarized monostratified epithelium, TJ form a barrier which regulates epithelial permeability and paracellular diffusion. For the first time, we demonstrated that human vaginal pluristratified epithelium expressed TJ proteins, in agreement with previous studies in animals' vagina [33] or in other human pluristratified tissues [22, 23]. We also provided evidence that human LC expressed TJ proteins, in particular Claudin 1 and ZO-1. Expression of TJ proteins in DC, especially in human DC is poorly described

and only Takano *et al.* demonstrated that HLA-DR⁺ CD11c⁺ DC in human nasal mucosa of allergic rhinitis express TJ proteins [22]. Studies in mouse models established that submucosal intestine DC express Occludin, Claudin-1 and ZO-1 [34], skin LC express Claudin-1 [35] and a particular mouse subset of lung DC Langerin⁺ expresses Claudin-1, -7 and ZO-2 [36]. To date, TJ functions in pluristratified epithelium especially in vagina and in DC, are still obscure. An interesting observation is that TEER was higher in the presence of LC in the reconstructed mucosa. Similarly, translocation of FITC-BSA in a 4 hours period was slower when LC are present in mucosa confirming that LC may influence the mucosal reconstruction barrier function. Thus, in steady-state, LC may directly enhance the cohesive structure within the epithelium or may release factors that influence this cohesion.

Previous works have established efficient transcytosis of HIV across monostratified epithelium. Transcytosis is a rapid transcellular transport of virions. Virions, budding at the contact site of HIV infected cells and epithelial cells forming a synapse [27] are internalized into epithelial endosome-like structures then released at the opposite pole of the cells. While transcytosis has been demonstrated in intestinal cell lines [5], no evidence of such mechanism has been observed in pluristratified mucosa [9, 10]. Bobardt *et al.* recently demonstrated that a very limited translocation of free virus particles occurred through a pseudo-monostratified genital mucosa after 16 hours [37]. Therefore, we provided new results showing that no transcellular or paracellular passage of HIV exist in pluristratified genital mucosa in the first hours of HIV infection.

Numerous studies have attributed to LC a crucial role in HIV spreading from mucosal sites in accordance to their location, phenotype and DC fonctionnal properties [6, 14,

30]. However, recent data suggested, in complete discrepancy with all previous studies, that LC does not mediate HIV transmission but rather prevent it [38]. They showed that virions were captured by Langerin and internalized into Birbeck granules before degradation. Therefore, the role of LC in HIV transmission across genital mucosa is still ambiguous and further studies should be done to clarify this question. Here, we showed that LC alone may not influence HIV transmission during the early infection steps. Nevertheless, LC role in HIV transmission may be dependent of their density within vaginal epithelium. Thus, whether LC density modulate vaginal HIV transmission, as proposed for foreskin transmission [39], has to be addressed. Several hypothesis can be proposed to explain HIV transmission across the vaginal mucosa. First, disruption of the vaginal integrity during trauma sex or caused by ulcerative lesions may enhance HIV infection [40]. Secondly, infection may occur by transmigration of infected mononuclear cells present in semen. This mechanism was first described by Tan *et al.* who reported that HIV infected T cells or monocytes adhere to monolayers of cervical epithelial cells then transmigrated [4]. Further *in vivo* studies confirmed that a limited transmigration of infected mononuclear cells exist through the mice vagina [41, 42]. Finally, LC or others vaginal immune cells may be involved in HIV transmission. A recent paper provided evidence that HIV enters simultaneously LC and intraepithelial T cells. Associated in conjugates, those cells migrate out of the mucosa to disseminate HIV. These interesting results indicate that LC and other immune cells such as intraepithelial T cells are both responsible for HIV spreading [15]. Therefore, the role of LC in HIV transmission at later infection stages and the role of infected cells, capable of forming conjugates with LC within the vaginal epithelium, remain to be studied.

HIV entry through vaginal mucosa after sexual intercourse represents the initial step of the majority of HIV worldwide infection. In this context, microbicides are urgently needed to prevent its sexual transmission. Unfortunately, different clinical trials testing nonoxynol-9 [43] or cellulose sulfate were suddenly interrupted as an increase in HIV infection occurred in the control groups. Thus, to avoid such disappointing experience, promising microbicides should be preclinically tested on appropriate models in order to better evaluate any cell cytotoxicity. Thus, we present here an interesting and effective model for the evaluation of potential microbicides before their use in clinical trials. Indeed, providing histological and electron microscopy examination, we can evaluate physical disruptions and clues of inflammation, by examining the released of inflammatory cytokines and chemokines in supernatants and analysing LC phenotype and functions. In conclusion, our reconstructed vagina will open new perspectives in microbicides exploration and in studying the early HIV infection events.

Acknowledgments

This work was supported by grants by the Agence Nationale de la Recherche contre le SIDA (ANRS) and SIDACTION. MB is supported by ANRS.

References

1. Shattock RJ, Moore JP. **Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection.** *Nat Rev Microbiol* 2003,1:25-34.
2. Latif AS, Katzenstein DA, Bassett MT, Houston S, Emmanuel JC, Marowa E. **Genital ulcers and transmission of HIV among couples in Zimbabwe.** *Aids* 1989,3:519-523.
3. Guenther PC, Secor WE, Dezzutti CS. **Trichomonas vaginalis-induced epithelial monolayer disruption and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication: implications for the sexual transmission of HIV-1.** *Infect Immun* 2005,73:4155-4160.
4. Tan X, Phillips DM. **Cell-mediated infection of cervix derived epithelial cells with primary isolates of human immunodeficiency virus.** *Arch Virol* 1996,141:1177-1189.

5. Bomsel M. **Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier.** *Nat Med* 1997,3:42-47.
6. Kawamura T, Cohen SS, Borris DL, Aquilino EA, Glushakova S, Margolis LB, *et al.* **Candidate microbicides block HIV-1 infection of human immature Langerhans cells within epithelial tissue explants.** *J Exp Med* 2000,192:1491-1500.
7. Bomsel M, Heyman M, Hocini H, Lagaye S, Belec L, Dupont C, Desgranges C. **Intracellular neutralization of HIV transcytosis across tight epithelial barriers by anti-HIV envelope protein dIgA or IgM.** *Immunity* 1998,9:277-287.
8. Meng G, Wei X, Wu X, Sellers MT, Decker JM, Moldoveanu Z, *et al.* **Primary intestinal epithelial cells selectively transfer R5 HIV-1 to CCR5+ cells.** *Nat Med* 2002,8:150-156.
9. Collins KB, Patterson BK, Naus GJ, Landers DV, Gupta P. **Development of an in vitro organ culture model to study transmission of HIV-1 in the female genital tract.** *Nat Med* 2000,6:475-479.
10. Greenhead P, Hayes P, Watts PS, Laing KG, Griffin GE, Shattock RJ. **Parameters of human immunodeficiency virus infection of human cervical tissue and inhibition by vaginal virucides.** *J Virol* 2000,74:5577-5586.
11. Hu J, Gardner MB, Miller CJ. **Simian immunodeficiency virus rapidly penetrates the cervicovaginal mucosa after intravaginal inoculation and infects intraepithelial dendritic cells.** *J Virol* 2000,74:6087-6095.
12. Zhang Z, Schuler T, Zupancic M, Wietgreffe S, Staskus KA, Reimann KA, *et al.* **Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells.** *Science* 1999,286:1353-1357.
13. Gupta P, Collins KB, Ratner D, Watkins S, Naus GJ, Landers DV, Patterson BK. **Memory CD4(+) T cells are the earliest detectable human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected cells in the female genital mucosal tissue during HIV-1 transmission in an organ culture system.** *J Virol* 2002,76:9868-9876.
14. Sivard P, Berlier W, Picard B, Sabido O, Genin C, Misery L. **HIV-1 infection of Langerhans cells in a reconstructed vaginal mucosa.** *J Infect Dis* 2004,190:227-235.
15. Hladik F, Sakchalathorn P, Ballweber L, Lentz G, Fialkow M, Eschenbach D, McElrath MJ. **Initial Events in Establishing Vaginal Entry and Infection by Human Immunodeficiency Virus Type-1.** *Immunity* 2007,26:257-270.
16. Dezutter-Dambuyant C, Schmitt DA, Dusserre N, Hanau D, Kolbe HV, Kieny MP, *et al.* **Trypsin-resistant gp120 receptors are upregulated on short-term cultured human epidermal Langerhans cells.** *Res Virol* 1991,142:129-138.
17. Valladeau J, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C, Moore K, Kleijmeer M, Liu Y, *et al.* **Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules.** *Immunity* 2000,12:71-81.
18. Lagaye S, Derrien M, Menu E, Coito C, Tresoldi E, Mauclere P, *et al.* **Cell-to-cell contact results in a selective translocation of maternal human immunodeficiency virus type 1 quasispecies across a trophoblastic barrier by both transcytosis and infection.** *J Virol* 2001,75:4780-4791.
19. Black AF, Bouez C, Perrier E, Schlotmann K, Chapuis F, Damour O. **Optimization and characterization of an engineered human skin equivalent.** *Tissue Eng* 2005,11:723-733.

20. Dezutter-Dambuyant C, Black A, Bechetoille N, Bouez C, Marechal S, Auxenfans C, *et al.* **Evolutive skin reconstructions: from the dermal collagen-glycosaminoglycan-chitosane substrate to an immunocompetent reconstructed skin.** *Biomed Mater Eng* 2006,16:S85-94.
21. Regnier M, Staquet MJ, Schmitt D, Schmidt R. **Integration of Langerhans cells into a pigmented reconstructed human epidermis.** *J Invest Dermatol* 1997,109:510-512.
22. Takano K, Kojima T, Go M, Murata M, Ichimiya S, Himi T, Sawada N. **HLA-DR- and CD11c-positive dendritic cells penetrate beyond well-developed epithelial tight junctions in human nasal mucosa of allergic rhinitis.** *J Histochem Cytochem* 2005,53:611-619.
23. Schluter H, Wepf R, Moll I, Franke WW. **Sealing the live part of the skin: the integrated meshwork of desmosomes, tight junctions and curvilinear ridge structures in the cells of the uppermost granular layer of the human epidermis.** *Eur J Cell Biol* 2004,83:655-665.
24. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. **Multifunctional strands in tight junctions.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001,2:285-293.
25. Steimer A, Franke H, Haltner-Ukomado E, Laue M, Ehrhardt C, Lehr CM. **Monolayers of porcine alveolar epithelial cells in primary culture as an in vitro model for drug absorption studies.** *Eur J Pharm Biopharm* 2007,66:372-382.
26. Van Herrewege Y, Michiels J, Waeytens A, De Boeck G, Salden E, Heyndrickx L, *et al.* **A dual chamber model of female cervical mucosa for the study of HIV transmission and for the evaluation of candidate HIV microbicides.** *Antiviral Res* 2006.
27. Alfsen A, Yu H, Magerus-Chatinet A, Schmitt A, Bomsel M. **HIV-1-infected blood mononuclear cells form an integrin- and agrin-dependent viral synapse to induce efficient HIV-1 transcytosis across epithelial cell monolayer.** *Mol Biol Cell* 2005,16:4267-4279.
28. Kissenpennig A, Henri S, Dubois B, Laplace-Builhe C, Perrin P, Romani N, *et al.* **Dynamics and function of Langerhans cells in vivo dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells.** *Immunity* 2005,22:643-654.
29. Cremel M, Hamzeh-Cognasse H, Genin C, Delezay O. **Female genital tract immunization: evaluation of candidate immunoadjuvants on epithelial cell secretion of CCL20 and dendritic/Langerhans cell maturation.** *Vaccine* 2006,24:5744-5754.
30. Blauvelt A, Glushakova S, Margolis LB. **HIV-infected human Langerhans cells transmit infection to human lymphoid tissue ex vivo.** *Aids* 2000,14:647-651.
31. Kawamura T, Gulden FO, Sugaya M, McNamara DT, Borris DL, Lederman MM, *et al.* **R5 HIV productively infects Langerhans cells, and infection levels are regulated by compound CCR5 polymorphisms.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2003,100:8401-8406.
32. Sivard P, Dezutter-Dambuyant C, Kanitakis J, Mosnier JF, Hamzeh H, Bechetoille N, *et al.* **In vitro reconstructed mucosa-integrating Langerhans' cells.** *Exp Dermatol* 2003,12:346-355.
33. Langbein L, Grund C, Kuhn C, Praetzel S, Kartenbeck J, Brandner JM, *et al.* **Tight junctions and compositionally related junctional structures in**

- mammalian stratified epithelia and cell cultures derived therefrom.** *Eur J Cell Biol* 2002,81:419-435.
34. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, *et al.* **Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria.** *Nat Immunol* 2001,2:361-367.
 35. Zimmerli SC, Hauser C. **Langerhans Cells and Lymph Node Dendritic Cells Express the Tight Junction Component Claudin-1.** *J Invest Dermatol* 2007.
 36. Sung SS, Fu SM, Rose CE, Jr., Gaskin F, Ju ST, Beaty SR. **A major lung CD103 (alphaE)-beta7 integrin-positive epithelial dendritic cell population expressing Langerin and tight junction proteins.** *J Immunol* 2006,176:2161-2172.
 37. Bobardt MD, Chatterji U, Selvarajah S, Van der Schueren B, David G, Kahn B, Gallay PA. **Cell-free human immunodeficiency virus type 1 transcytosis through primary genital epithelial cells.** *J Virol* 2007,81:395-405.
 38. de Witte L, Nabatov A, Pion M, Fluitsma D, de Jong MA, de Gruijl T, *et al.* **Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells.** *Nat Med* 2007,13:367-371.
 39. McCoombe SG, Short RV. **Potential HIV-1 target cells in the human penis.** *Aids* 2006,20:1491-1495.
 40. Norvell MK, Benrubi GI, Thompson RJ. **Investigation of microtrauma after sexual intercourse.** *J Reprod Med* 1984,29:269-271.
 41. Zacharopoulos VR, Perotti ME, Phillips DM. **A role for cell migration in the sexual transmission of HIV-1?** *Curr Biol* 1997,7:534-537.
 42. Ibata B, Parr EL, King NJ, Parr MB. **Migration of foreign lymphocytes from the mouse vagina into the cervicovaginal mucosa and to the iliac lymph nodes.** *Biol Reprod* 1997,56:537-543.
 43. Van Damme L, Ramjee G, Alary M, Vuylsteke B, Chandeying V, Rees H, *et al.* **Effectiveness of COL-1492, a nonoxynol-9 vaginal gel, on HIV-1 transmission in female sex workers: a randomised controlled trial.** *Lancet* 2002,360:971-977.

Figures legend

Table 1: Primers used for RT-PCR analysis

Figure 1: Vaginal mucosa reconstruction and normal human vagina present similar morphology

A. Schematic representation of the various step of vaginal mucosal reconstruction.

B-C. Immunohistochemical analysis of normal human vagina and vaginal mucosa reconstructions. Collagen IV, Cytokeratin 13, Involucrin, Loricrin expression are shown in (B) and CD45 in (C). CD45⁺ cells are noted by arrows.

D. Confocal microscopy of Langerhans cells integrated in the vaginal mucosa reconstruction. Langerhans cells precursors were labeled with orange CMTMR (red) before seeding in the reconstructions. Nucleus were labeled with DAPI and reconstructions were subsequently analyzed by confocal microscopy. A top view of the mucosa reconstruction is shown. Scale bars = 20 μm. Open arrow shows the polycarbonate membrane containing 12μm pores.

Figure 2: Vaginal mucosa reconstruction expresses tight junction proteins

A. Immunohistochemical analysis of E-cadherin and tight junction proteins expression in normal human vagina and in vaginal mucosa reconstructions (Claudin 1, Claudin 4, Occludin and ZO-1). Scale bars = 20 μm.

B. Ultrastructure analysis of epithelial cell junctions. At the apical zone, tight junctions (yellow arrow) are present between 2 epithelial cells while desmosomes (white arrows) are widely displayed with surrounding epithelial cells. Scale bar = 3 μm.

C. TransEpithelial Electrical Resistance (TEER) values of reconstructed vaginal mucosa integrating or not Langerhans cells (LC). Values were representative of twelve independent reconstructions. (***) $P < 0.001$.

D. FITC-BSA passage through the vaginal mucosa reconstruction during 4 hours. 200 µg of FITC-BSA were incubated in the apical chamber, basal media were harvested and FITC-BSA amount were determined using a spectrofluorimeter. Values are representative of 3 different reconstructions. (* $P < 0.05$).

Figure 3: Freshly isolated Langerhans cells express tight junction proteins

A. RT-PCR analysis of mRNA encoding tight junction proteins on freshly isolated human Langerhans cells (LC), freshly isolated human epithelial cells (Ep) and freshly isolated human keratinocytes (K).

B. Flow cytometry analysis of tight junction proteins on freshly isolated Langerhans cells. Opened histograms represent the isotype match controls.

C. Immunofluorescent microscopy of ZO-1 expression on Langerhans cells (LC) (a) and at the junction between a keratinocyte (K) and a LC (b). Magnification : x 400.

Figure 4: HIV particles are not transmitted across the human vaginal mucosa and Langerhans cells do not increase HIV transmission

A. Schematic representation of HIV transmission assay across human vaginal reconstructions.

B. Reconstructed vaginal mucosa were exposed to 1.10^6 PBMC infected with 92BR025 (R5-virus) or 91US054 (X4-virus). After 4 hours of incubation, basal media were harvested and supernatants were separated from cell fractions. Supernatants were analyzed for HIV p24 level. 3 different reconstructions were analyzed for each point. NS= no significative level (< 10 pg/ml).

C. Ultrastructural analysis of infected reconstructed mucosa. No viral particles were observed within epithelial cells or in intercellular spaces after 4 hours of infection with R5-virus. 3 different blocks from 8 inserts were analyzed. Scale bar = 200 nm.

D. Reconstructed vaginal mucosa were exposed to 1.10^6 PBMC infected with 92BR025 (R5-virus) or 91US054 (X4-virus). After 4 hours of incubation, basal media were harvested and supernatants were separated from cell fractions. The cell fractions were further added to indicator PBMC for co-culture up to 7 days. Supernatants of these co-cultures were then analyzed for HIV p24. Results were representative of 3 independent reconstructions. NS= no significant level (< 10 pg/ml).

E. Prior to integration, LC were labeled with CMTMR (Orange) and HIV-infected PBMC were labeled with CMFDA (Green) before inoculation. After 4 hours of inoculation at the apical compartment, reconstructions were analyzed by confocal microscopy. Scale bar = 10 μ m.

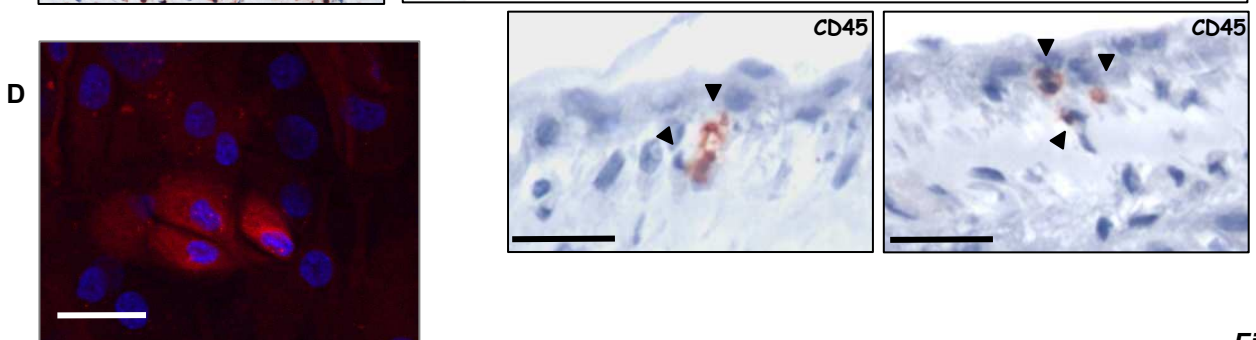
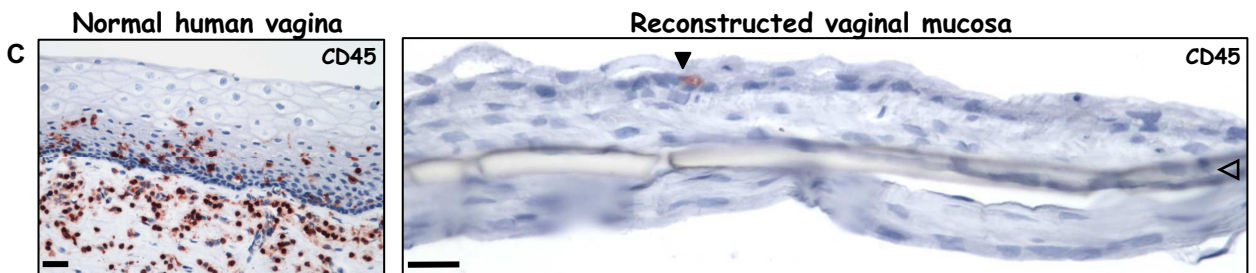
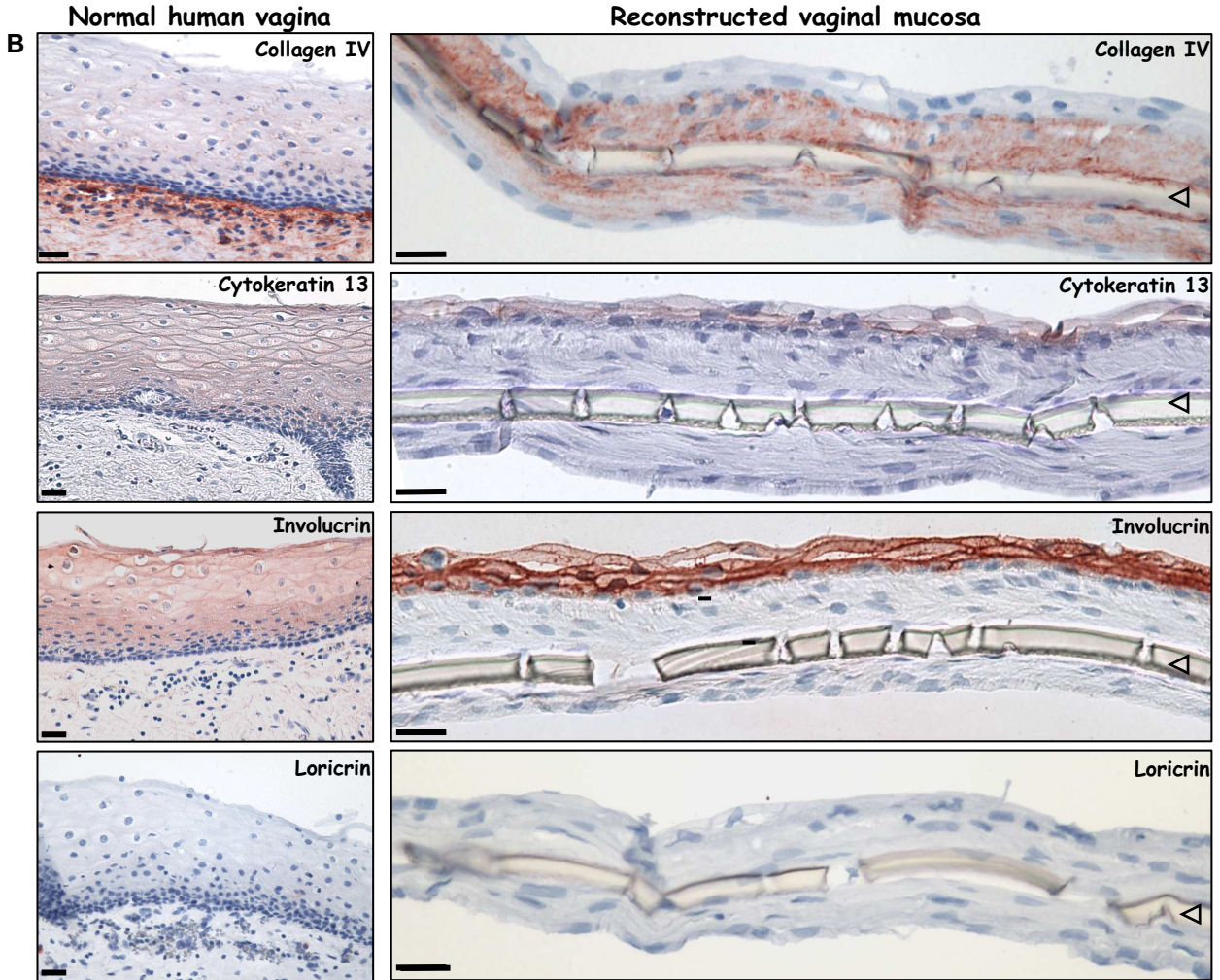
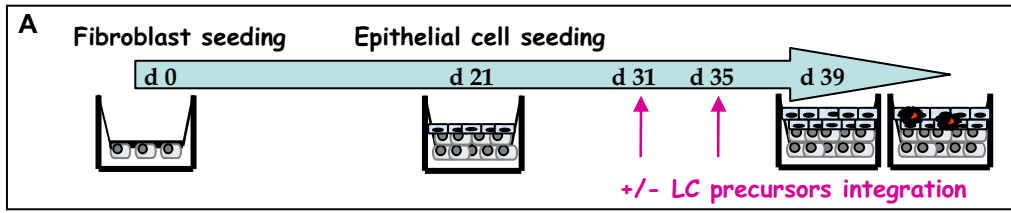
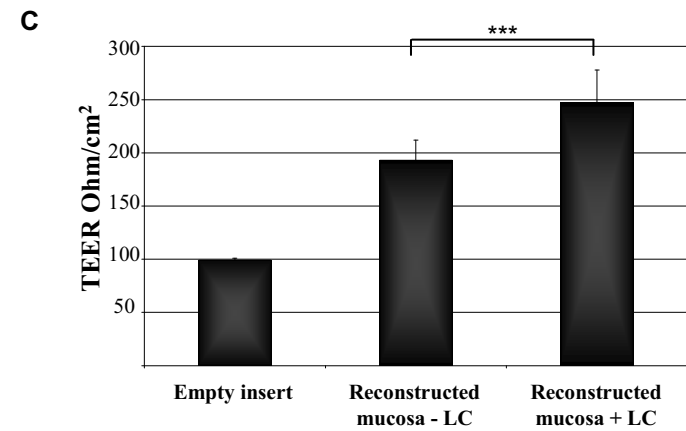
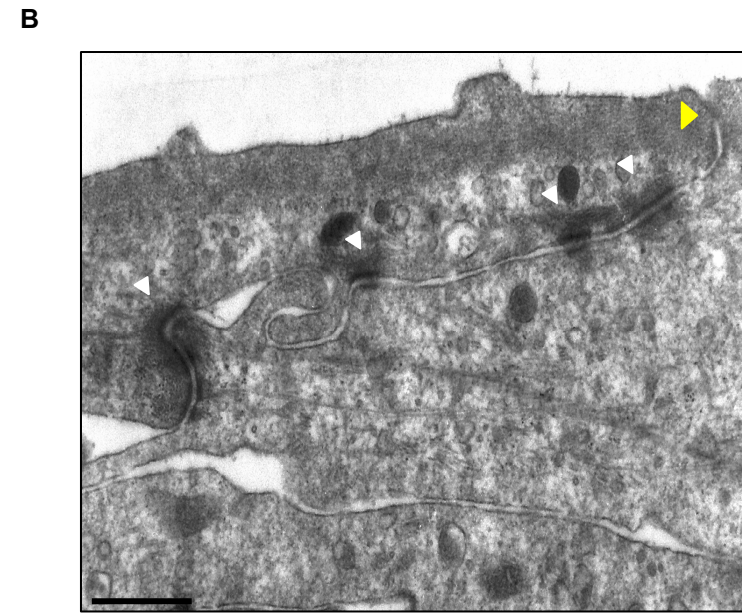
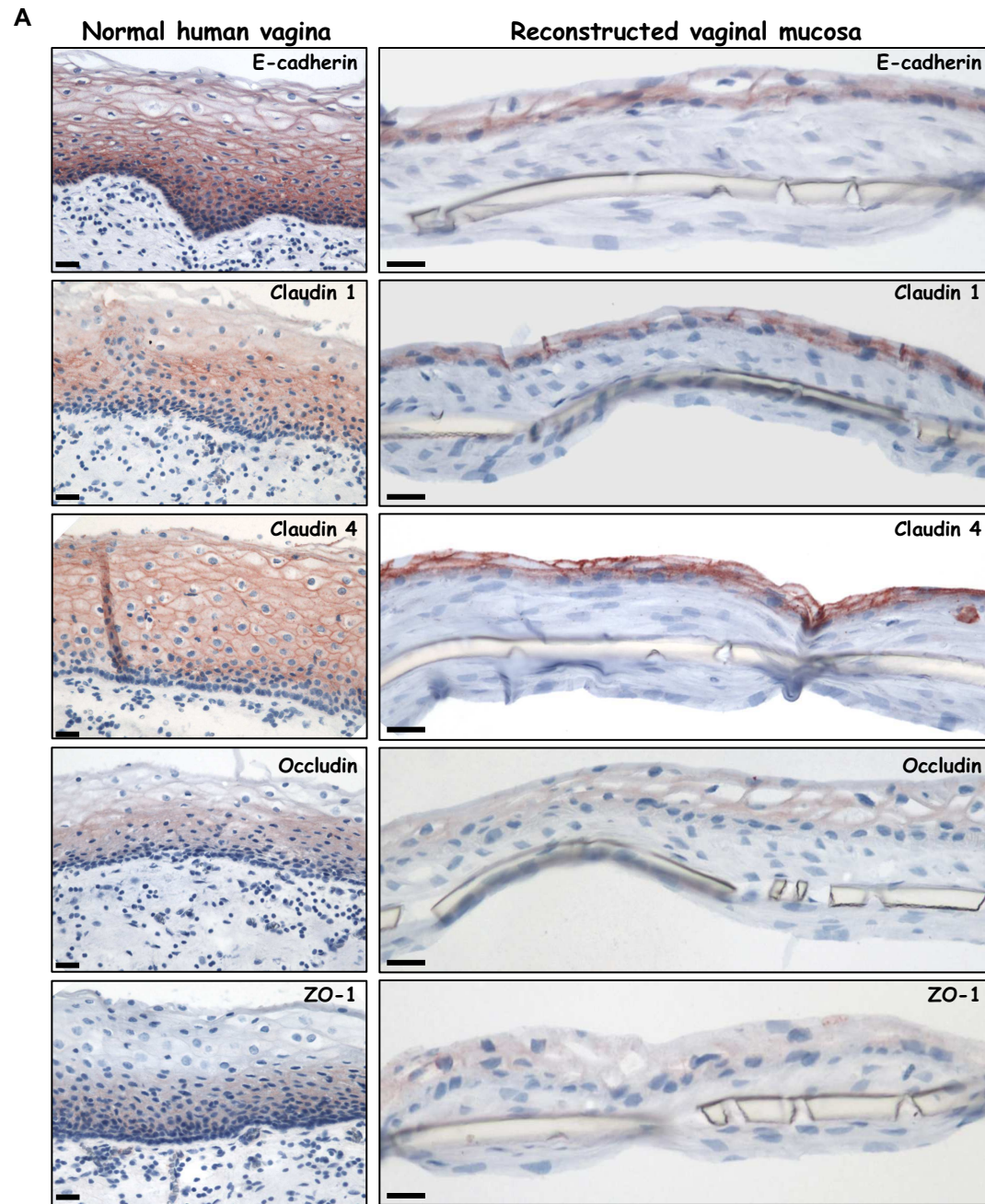


Figure 1



D

Basal compartment of	FITC-BSA (µg)
Mucosa reconstruction	26,26 ± 6,32
Mucosa reconstruction + LC	17,61 ± 3,07
Apical amount used	200

* indicates statistical significance between Mucosa reconstruction and Mucosa reconstruction + LC.

Figure 2

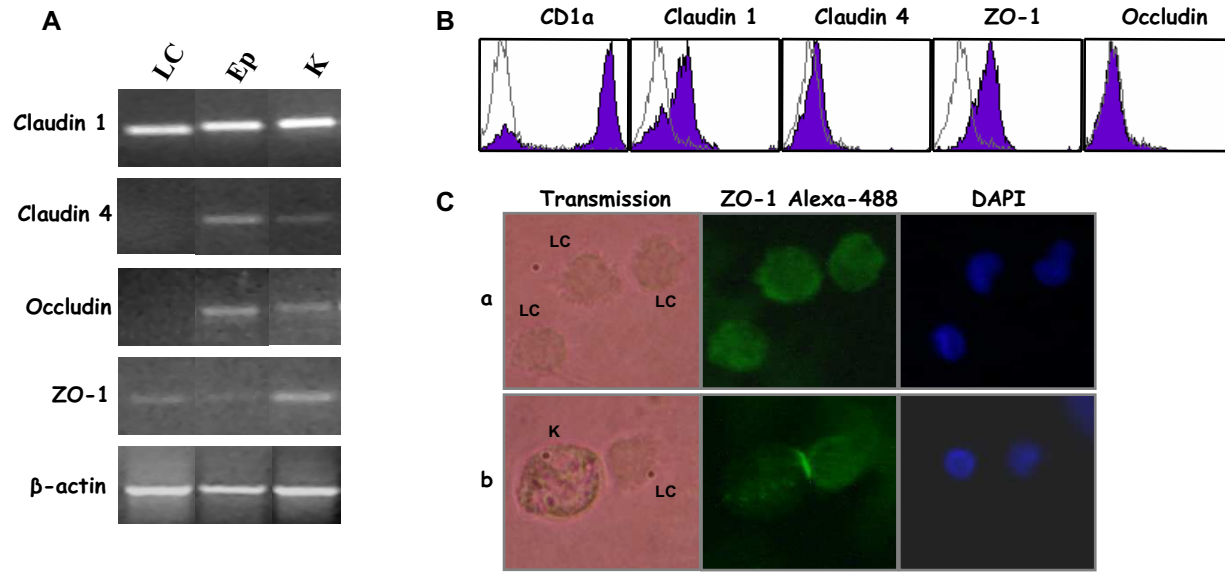


Figure 3

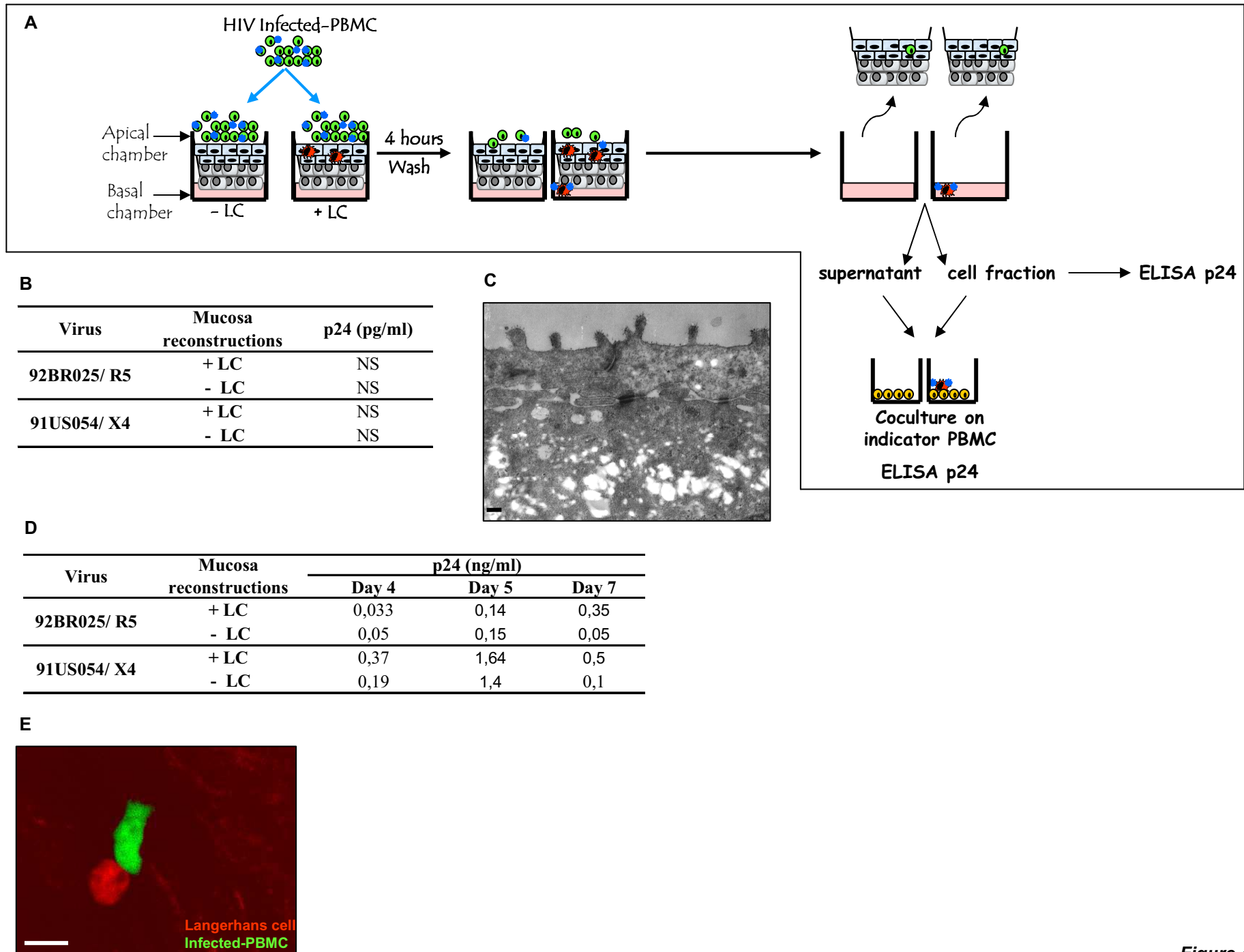


Figure 4

B. Discussion

1. Le modèle de muqueuse vaginale reconstruite

a. Nécessité du modèle

Dernièrement, de nouveaux essais cliniques, testant le microbicide cellulose de sulfate en application vaginale chez la femme, ont été arrêtés inopinément compte tenu du risque d'infection par le VIH plus élevé dans le groupe utilisant le cellulose sulfate que dans le groupe contrôle. L'annonce de ces résultats a soulevé des nombreuses questions au sein des groupes de recherche sur les microbicides, en particulier sur l'avenir de tels composés. Il est manifeste qu'il faut dorénavant, avant toute utilisation en essais cliniques, valider bien entendu l'activité anti-virale de ces composés mais également contrôler leur tolérance par la muqueuse génitale humaine, en plus des tests pré-cliniques chez l'animal. Cela permettra de limiter le nombre de microbicides testés en essais cliniques de manière à se focaliser sur les microbicides les plus efficaces et par ailleurs de vérifier l'absence de toxicité ou d'altérations de la muqueuse génitale humaine. Pour cela, les modèles *in vitro* cellulaires simples ne suffisent pas, l'action des microbicides doit être contrôlée sur des modèles plus complexes mimant plus physiologiquement la muqueuse génitale humaine.

b. Avantages du modèle

Mimer plus physiologiquement la muqueuse génitale ou tout autre tissu implique de modéliser son organisation dans l'espace en trois dimensions. Nous avons ainsi développé un modèle de muqueuse vaginale reconstruite, à partir de banques de cellules épithéliales vaginales et de fibroblastes humains primaires, contrairement à d'autres modèles utilisant des lignées cellulaires. Bien plus physiologique, le travail sur cellules primaires humaines est cependant plus difficile (viabilité des cellules moindre, nombre de passage réduit) rendant la mise au point du modèle longue et laborieuse.

Nous avons développé une muqueuse reconstruite complète, c'est-à-dire comprenant une *lamina propria* surmontée d'un épithélium pluristratifié. Les fibroblastes, ensemencés sur une membrane de polycarbonate de 12 μm de porosité, néo-synthétisent une matrice extracellulaire et forment ainsi un chorion équivalent. Sur ce chorion équivalent, les cellules épithéliales de vagin humain sont ensemencées. Grâce à une diminution de la concentration en sérum et une augmentation de la concentration calcique progressives, elles se différencient et stratifient afin de former un épithélium malpighien pluristratifié comprenant

quatre à six strates cellulaires. Par immuno-histochimie, l'expression de marqueurs spécifiques des muqueuses pluristratifiées non kératinisées a été contrôlée. Contrairement à d'autres modèles (Sivard et al., 2003; Cremel et al., 2006), grâce à l'utilisation de cellules primaires humaines et à la reconstitution de l'épithélium et de la *lamina propria*, notre muqueuse reconstruite reproduit très physiologiquement l'organisation de la muqueuse vaginale humaine normale.

Pour améliorer le modèle et dans le but d'étudier le rôle des CL de la muqueuse vaginale dans l'infection au VIH, nous avons intégré des précurseurs de CL CD34⁺ à 6 jours de culture comme précédemment décrit par Sivard et coll. (Sivard et al., 2003). Les progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ ont été cultivés 6 jours en présence de GM-CSF/SCF/TNF- α /TGF- β 1 de manière à les orienter dans la voie de différenciation langerhansienne. En culture, des précurseurs CD34⁺ cultivés avec ce cocktail cytokinique pendant 6 jours, puis en GM-CSF/TGF- β 1 les 6 jours suivants, génèrent des CL langerin⁺ CD1a⁺ E-Cadhérine⁺. Au sein de l'environnement épithélial reconstruit, les progéniteurs intégrés vont achever leur différenciation en CL. Malheureusement, nous n'avons pas pu contrôler *in situ* l'expression de la langerin ou de CD1a en raison de la non compatibilité de nos anticorps avec la paraffine utilisée pour inclure les muqueuses reconstruites. Seule l'expression de HLA-DR et CD45 ainsi que la localisation des cellules au sein de l'épithélium reconstruit confirme que les cellules intégrées se sont différenciées en CL.

La présence unique de CL dans ce modèle permet l'analyse spécifique de leur rôle dans la transmission du VIH par voie génitale. En effet, les modèles antérieurs, utilisant des explants cervicaux ou vaginaux *ex vivo* ne permettent pas d'étudier précisément le rôle des CL dans l'infection compte tenu de la présence de LT intra-épithéliaux, de LT et de macrophages au sein de la *lamina propria* (Collins et al., 2000; Greenhead et al., 2000; Hladik et al., 2007). Ainsi, en modélisant une muqueuse intégrant uniquement des CL dans l'épithélium, nous pouvons évaluer spécifiquement le rôle de ces DC dans l'immunité de la muqueuse, en particulier lors de l'infection par le VIH. Cela pourrait être également utile pour l'étude d'autres infections sexuellement transmissibles telles que les infections par papillomavirus ou par *Chlamydia*.

Notre modèle est reconstruit de part et d'autre d'une membrane de polycarbonate de 12 µm de porosité. L'utilisation de cette membrane, compte tenu de la taille de ses pores, permet la migration de cellules à travers la muqueuse, reconstruite de part et d'autre de la membrane. De plus, contrairement au modèle de P. Sivard dont l'épithélium est reconstruit sur un DED (Derme Mort Désépidermisé), notre muqueuse (épithélium + *lamina propria*) permet l'analyse du compartiment basal. D'une part, la présence de cellules ayant migré hors de la muqueuse peut être analysée. En marquant les progéniteurs CD34⁺ à 6 jours de culture juste avant l'intégration dans la muqueuse avec un marqueur intravital de type « *Cell Tracker* », nous pourrions, par des techniques d'imagerie confocale en temps réel, suivre à différent temps la migration des CL à travers la muqueuse. De plus, dans le cas de l'infection par le VIH, nous pourrions également mesurer la présence de particules virales en détectant la quantité d'antigène p24 par ELISA dans le compartiment basal. Enfin, notre modèle sera très utile pour évaluer l'effet de microbicide sur le tissu vaginal humain. Dans un premier temps, nous pourrions analyser l'intégrité de la muqueuse par observation en microscopie électronique et immuno-histochimie sur coupes et par des mesures de TEER. Dans un second temps, nous pourrions analyser le profil d'expression de cytokines et chimiokines par des puces à cytokines ou chimiokines dans les muqueuses contrôles (conditions normales) *versus* les muqueuses utilisant des microbicides. Ce profil d'expression permettra de déterminer si les microbicides ont induit une modification de l'environnement cytokinique du vagin et ainsi contrôler l'induction d'une inflammation. En conséquence, la muqueuse reconstruite que nous avons développée représente un modèle très pertinent à la fois pour la détermination du rôle des CL dans l'infection par le VIH et pour l'évaluation pré-clinique de microbicides tels que des inhibiteurs d'entrée virale.

2. Expression des protéines des jonctions serrées par les épithéliums pluristratifiés génitaux

Lors de l'analyse de la structure des muqueuses reconstruites en microscopie électronique, nous avons observé la présence de structures identiques aux jonctions serrées présentes dans les épithéliums monostratifiés. Nous nous sommes alors interrogées sur l'existence de telles structures au sein des épithéliums pluristratifiés. La présence de jonction serrées a été décrite ces dernières années dans certains épithéliums pluristratifiés humains tels que l'épiderme (Brandner et al., 2002; Schluter et al., 2004), l'épithélium de la crypte de l'amygdale (Go et al., 2004), du larynx (Gill et al., 2005) et de la muqueuse nasale (Takano et

al., 2005). Nous avons alors recherché la présence de ces protéines des jonctions serrées dans la muqueuse pluristratifiée vaginale.

Nous avons démontré que dans l'épithélium vaginal humain, l'expression de Claudin-1 et -4 est retrouvée dans toutes les couches, de la couche parabasale aux couches les plus différenciées (l'expression de Claudin-1 s'atténue avec la différenciation). L'expression de l'Occludin et de ZO-1 reste, quant à elle, limitée aux couches les plus profondes, de manière similaire à l'épiderme où ces protéines sont principalement exprimées dans les couches granuleuses et spineuses (Brandner et al., 2002; Schluter et al., 2004).

Lors de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressées tout d'abord à la transmission du VIH à travers la muqueuse génitale féminine. La transmission chez l'homme *via* le pénis et le prépuce étant peu étudiée, nous avons projeté de poursuivre notre étude sur la transmission du VIH à travers la muqueuse génitale masculine. Dans le cadre d'une collaboration ANRS entre notre Laboratoire et le Laboratoire de M. Bomsel de l'Institut Cochin de Paris, je me suis rendue à Paris pour mettre en place le système de reconstruction de muqueuse de prépuce. J'ai transféré la technologie à Y. Ganor, qui termine maintenant la mise au point de la muqueuse reconstruite de prépuce humain. En parallèle à ce transfert technologique, nous avons évalué si la muqueuse pluristratifiée du prépuce exprime également des protéines des jonctions serrées. Contrairement au vagin, seuls Claudin-4 et Occludin sont exprimés dans le prépuce humain et ce essentiellement au niveau de la couche granuleuse ([Figure 6 supplémentaire](#)). Ainsi, nous avons établi pour la première fois, l'expression de protéines des jonctions serrées dans le prépuce et dans la muqueuse génitale pluristratifiée. Dans ce contexte, seuls les travaux de Takano et coll. ont étudié l'expression de Occludin, ZO-1 et Claudin-1 mais uniquement sur des monocouches de cellules épithéliales cervicales (Takano et al., 2005). Quel rôle ont ces structures dans l'épithélium génital pluristratifié ? Les jonctions serrées des épithéliums génitaux joueraient un rôle dans l'établissement de la fonction barrière de l'épithélium tout en permettant le passage de solutés. Certains pathogènes ou protéines de pathogènes tels que la protéine Derp 1 des acariens, sont capables d'altérer les jonctions serrées d'un épithélium pour faciliter leur dispersion dans l'organisme (Wan et al., 2001). Par ailleurs, d'autres travaux ont démontré que la protéine virale Tat affecte l'expression et la distribution de certaines protéines des jonctions serrées des cellules endothéliales du cerveau (Andras et al., 2003; Pu et al., 2005).

Le VIH altère-t-il les jonctions serrées de la muqueuse vaginale afin de faciliter sa transmission ? Afin d'évaluer la modulation potentielle des protéines des jonctions serrées par le VIH, nous pourrions, après infection de la muqueuse reconstruite par le VIH, estimer la modification de la perméabilité de la muqueuse par la mesure de la TEER et passage de BSA-FITC. Puis par microscopie confocale, nous pourrions examiner la régulation de l'expression de protéines des jonctions serrées à différents temps en suivant en parallèle le passage du VIH à travers la muqueuse vaginale. Enfin, la détermination précise de la protéine des jonctions serrées altérée par le VIH pourra être analysée par utilisation d'ARN interférents.

3. Expression des protéines des jonctions serrées par les cellules de Langerhans

Lors de la mesure de la Résistance Electrique Trans-Epithéliale (TEER) et du passage de BSA-FITC, mesures destinées à contrôler l'intégrité et la cohésion des muqueuses vaginales reconstruites, nous avons observé d'une part que les valeurs de TEER étaient plus élevées dans les muqueuses intégrant des CL, et que d'autre part, dans ces muqueuses le passage de BSA-FITC était plus faible que dans les muqueuses ne contenant pas de CL. Comment la présence des CL dans la muqueuse augmente-t-elle l'intégrité et l'imperméabilité de la muqueuse ? (i) La présence des CL au sein de l'épithélium pourrait induire indirectement le renforcement de la cohésion et de l'intégrité de la muqueuse *via* la sécrétion de cytokines. Grâce à l'analyse de puces à cytokines, le profil de cytokines sécrétées dans les muqueuses sans CL pourra être comparé à celui des muqueuses intégrant des CL. (ii) La présence des CL au sein de l'épithélium pourrait induire directement l'augmentation de la TEER et la diminution du passage de BSA-FITC, en renforçant les jonctions serrées de l'épithélium dans lequel elles sont intégrées. Nous avons alors étudié l'expression des jonctions serrées par les CL. La majorité des études détaillant l'expression des protéines des jonctions serrées par les DC portent sur les DC murines et seuls les travaux de Takano et coll. démontrent que l'épithélium nasal contient des DC HLA-DR⁺ CD11c⁺ exprimant Claudin-1 (Takano et al., 2005). Nous avons démontré dans cette étude, pour la première fois, que les CL humaines expriment Claudin-1 et ZO-1. Nos résultats sont en adéquation avec les récents résultats établis chez la souris qui montrent que les CL de la peau expriment Claudin-1 (Zimmerli and Hauser, 2007). Ainsi, les CL seraient capable de former des jonctions serrées avec les cellules épithéliales de leur environnement.

De manière très intéressante, chez la souris, les DC intestinales (exprimant Claudin-1, Occludin et ZO-1), décrites par Rescigno et coll., sont capables d'envoyer leurs dendrites vers le milieu extérieur de l'épithélium où elles sont présentes afin de capturer des antigènes sans détériorer l'intégrité de la muqueuse. (Rescigno et al., 2001). Les CL humaines pourraient, de manière similaire envoyer leurs dendrites vers la lumière de la muqueuse vaginale afin de capturer des antigènes tels que des particules virales lors de l'infection par le VIH. Par leur expression des protéines des jonctions serrées, les CL pourraient reformer les jonctions serrées ouvertes de manière à maintenir la cohésion de l'épithélium. Cependant, cela serait très surprenant au vue des la position occupée par les CL dans l'épithélium vaginal. Nous pourrions évaluer la validité de cette hypothèse en examinant, par vidéo-microscopie, le déplacement des CL au sein de l'épithélium reconstruit pour capturer le VIH, ainsi que la préservation des jonctions serrées (Rescigno et al., 2001).

4. Passage du VIH par transcytose à travers les cellules épithéliales vaginales ?

Au sein des épithéliums monostratifiés tels que l'épithélium intestinal ou placentaire, le passage du VIH s'effectuerait par transcytose (Bomsel, 1997; Lagaye et al., 2001). La transcytose est un mécanisme rapide (réalisé durant les deux premières heures post-infection). Ce mécanisme n'est efficace qu'en présence de cellules infectées (Bomsel, 1997; Alfsen et al., 2005). En effet, les cellules infectées adhèrent à la surface de l'épithélium ce qui induit une libération massive de particules virales, qui sont ensuite transportées dans des structures endosomales du pôle apical au pôle basal de la cellule épithéliale (Alfsen et al., 2005). Nous avons démontré dans cette étude qu'aucune particule virale néo-synthétisée par les PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, cellules mononucléées du sang périphérique) infectés par du virus R5 et X4 n'est détectée après 4 heures dans le compartiment basal. De même, à des temps plus longs (après 24 heures), aucune particule virale libre n'est détectée (Figure 8 supplémentaire). Il semble alors qu'aucune translocation de virus ne se produise à travers l'épithélium vaginal pluristratifié, à moins que de rares particules non détectables ne soient passées (malgré le seuil de sensibilité de 10 pg/ml du kit ELISA utilisé). Récemment, Bobardt et coll. ont démontré qu'une faible transcytose du VIH (< 0.02% de l'inoculum) existe dans les muqueuses génitales (Bobardt et al., 2007). Cependant, son étude utilisant des cellules vaginales issues de frottis, donc différenciées et cultivées en pseudo-monocouche, ne

permet pas d'appréhender l'existence d'un tel phénomène au sein de la muqueuse pluristratifiée vaginale. Par des techniques d'immuno-marquages en microscopie électronique (marquage de protéines virales), nous pourrions rechercher la présence de particules virales dans des compartiments endosomaux des cellules épithéliales et ainsi clairement déterminer que le virus n'est pas transmis pas transcytose et que les cellules épithéliales génitales ne sont pas infectées, comme précédemment démontré (Dezzutti et al., 2001; Wu et al., 2003).

De manière très intéressante, après 24 heures d'infection, la co-culture de la fraction cellulaire du compartiment basal avec des PBMC rapporteurs, révèle que le VIH est passé à travers la muqueuse vaginale (Figure 9 supplémentaire). Quelles sont les cellules responsables de ce passage à des temps plus longs ?

5. Rôle des cellules de Langerhans dans la transmission du VIH

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressées au rôle des CL à des temps précoces de l'infection par le VIH. Nous montrons dans cet article que les CL n'influencent ni le passage de particules néo-synthétisées par les PBMC infectées ni l'infection de PBMC rapporteurs en co-culture après 4 heures d'infection. En 4 heures, les CL n'ont peut-être pas encore quitté le compartiment épithélial et sont toujours en cours de migration dans la muqueuse. L'analyse en microscopie confocale des muqueuses reconstruites 4 heures post-infection intégrant des CL préalablement colorées par un marqueur intravital fluorescent, permettra de déterminer la localisation des CL après 4 heures. Par ailleurs, les travaux chez la souris de R. Allan, après infection par HSV1, démontrent que les CL atteignent tardivement les ganglions lymphatiques (plus de 48 heures post-infection) (Allan et al., 2006). L'étude du rôle des CL dans l'infection devrait être donc analysée à des temps plus longs. Nous nous sommes alors intéressées au rôle des CL après 24 heures d'infection. A 24 heures post-infection, les CL augmentent de façon très significative l'infection par des virus de type X4 des PBMC rapporteurs. En effet, dans les muqueuses intégrant des CL, une forte co-infection des PBMC rapporteurs est détectée à partir du 5^{ème} jour de culture, en comparaison avec les muqueuses n'intégrant pas de CL (Figure 9 supplémentaire a). Les CL, exprimant CXCR4 et CCR5 (Tchou et al., 2001) sont donc capables de transférer l'infection de virus de tropisme X4. De manière très surprenante, nos résultats démontrent, qu'au contraire, les CL ne favorisent pas la co-infection des PBMC rapporteurs pour les virus de

type R5 (Figure 9 supplémentaire b). Ainsi, il semble que les CL ne facilitent que dans la transmission des virus de type X4, lorsqu'elles sont les seules à être en contact avec le virus comme dans notre modèle.

Par quels mécanismes les CL ont-elles préférentiellement transmis des virus de tropisme X4 dans ce modèle d'infection alors qu'il est communément admis au contraire qu'elles transmettent sélectivement les virus de type R5 (Reece et al., 1998; Kawamura et al., 2003), et que ce sont majoritairement des souches R5 qui sont retrouvées dans l'organisme après primo-infection (Zhu et al., 1993) ?

(i) Tout d'abord, nous devrions confirmer nos résultats en utilisant d'autres souches virales et en particulier des souches de laboratoire extensivement utilisées par d'autres équipes telles que les souches BaL ou Lai (Reece et al., 1998; Kawamura et al., 2003).

(ii) Lors de l'infection par des virus de type R5, la capacité des CL à migrer hors de la muqueuse a peut-être été altérée ? Malheureusement, bien que colorées avant intégration avec un marqueur intravital fluorescent, nous n'avons pas été en mesure de détecter des CL migrantes dans le compartiment basal après 24 heures post-infection. En effet, leur nombre au sein de l'épithélium reconstruit étant faible, il est très difficile de visualiser celles ayant migré.

(iii) Les cellules épithéliales séquestrent peut-être les virus de type R5 permettant ainsi la transmission préférentielle de virus de type X4. Nous n'avons été en mesure d'évaluer l'expression de CCR5 et de CXCR4 sur les muqueuses reconstruites, les anticorps commercialisés ne marchant pas efficacement sur les tissus inclus en paraffine Histowax®. Cependant, les données de la littérature révèlent que, contrairement aux cellules épithéliales intestinales, les cellules épithéliales vaginales exprimeraient les deux co-récepteurs viraux CCR5 et CXCR4 (McClure et al., 2005; Bobardt et al., 2007). Par ailleurs, il a été démontré que l'expression par les cellules épithéliales de SDF-1 α , ligand de CXCR4, induit l'internalisation de CXCR4, bloquant ainsi la transmission des virus de type X4 (Agace et al., 2000). Nous pourrions, de la même manière, évaluer si l'expression d'un ligand de CCR5, comme RANTES, par les cellules épithéliales des muqueuses reconstruites induit la *down-regulation* de CCR5. De plus, nous pourrions examiner si les cellules épithéliales peuvent séquestrer les virus de type R5, permettant ainsi une transmission préférentielle de virus X4, de même similaire aux lignées de cellules épithéliales séquestrant les virus de type X4 (Berlier et al., 2005).

(iv) La présence de LT intra-épithéliaux dans le vagin pourrait permettre la transmission sélective de virus de tropisme R5 (Figure 10 supplémentaire). En effet, les travaux de Hladik et coll. démontrent que les LT intra-épithéliaux expriment majoritairement CCR5 (Hladik et al., 1999). Par ailleurs, dans une étude récente, ils démontrent que les CL et les T intra-épithéliaux migrent conjointement hors du compartiment vaginal après endocytose du VIH par les CL et infection des LT intra-épithéliaux (Hladik et al., 2007). Dès lors, la présence non négligeable de tels LT (Figure 10 sup) dans l'épithélium vaginal humain pourrait expliquer la sélection préférentielle des virus de tropisme R5 observée dans la muqueuse vaginale (Kawamura et al., 2003). Afin de valider une telle hypothèse, nous pourrions améliorer notre muqueuse reconstruite par l'ajout de LT intra-épithéliaux. En colorant les CL et les LT par des marqueurs fluorescents différents, nous pourrions suivre chaque type cellulaire et son implication dans l'infection par des virus de tropisme R5 ou X4, par vidéo-microscopie.

(v) Les DC interstitielles présentent au sein de la *lamina propria* pourraient jouer, tels que les DDC de la peau, un rôle différent des CL dans l'immunité des muqueuses et en particulier dans la transmission préférentielle du VIH de type R5. Nous pourrions ainsi évaluer leur rôle dans la transmission du VIH en améliorant notre muqueuse reconstruite par l'ajout de ces DC dans la *lamina propria*.

6. Transmigration de cellules infectées ?

Les cellules infectées passent peut-être directement à travers l'épithélium pour disséminer l'infection. L'existence d'un tel mécanisme a été décrit pour la première fois par Tan et coll. qui ont montré que des monocytes ou des LT infectés par le VIH pouvaient adhérer à la monocouche de cellules épithéliales cervicales puis transmigrer (Tan and Phillips, 1996). Par la suite, d'autres études ont confirmé qu'une transmigration, minime, s'opérait à travers le vagin murin (Ibata et al., 1997; Zacharopoulos et al., 1997; Di Fabio et al., 2001). Les résultats des co-cultures de PBMC activés ont révélé qu'en absence de CL, une infection des PBMC rapporteurs était réalisée, indiquant l'implication possible d'autres cellules. Nous avons alors analysé les milieux basaux à 4 heures et 24 heures post-infection. Des cellules CMFDA⁺ (« *Cell Tracker* » vert) ont été détectées à 24 heures révélant, qu'à 24 heures post-infection, des PBMC infectées par du virus de type R5 ou de type X4 ont transmigré à travers la muqueuse vaginale (Figure 11 supplémentaire). Ainsi, chez l'homme,

des cellules mononucléées infectées pourraient transmigrer pour disséminer le VIH à travers la muqueuse vaginale.

Quelles sont ces cellules infectées, des LT ou des monocytes ? Est-ce que les cellules mononucléées infectées dans le sperme pourraient avoir les mêmes propriétés ? Telles sont les questions auxquelles les futurs travaux doivent répondre. Ainsi, l'analyse par cytométrie en flux des cellules ayant migré à travers la muqueuse et récoltées dans le compartiment basal, nous révélera l'identité de ces cellules. Par ailleurs, pour évaluer le plus physiologiquement ce phénomène de transmigration, nous pourrions infecter les muqueuses avec du sperme de patients infectés. De cette manière, nous analyserons la transmission du VIH à travers la muqueuse vaginale de manière physiologique comme celle s'opérant lors d'un rapport sexuel. Nous pourrions ainsi établir si les cellules mononucléées infectées du sperme sont capables de transmigrer à travers la muqueuse afin de disséminer l'infection.

En conclusion, le mécanisme de transmission du VIH à travers la muqueuse vaginale semble multiple. Le développement d'une protection efficace se fera alors préférentiellement par l'utilisation combinée de plusieurs microbicides, ciblant des voies d'entrée différentes.

Conclusion

Ce travail de thèse a permis de définir les profils d'expression des récepteurs de l'immunité innée par les cellules dendritiques cutanées humaines fraîchement isolées. Cette connaissance des *Pattern Recognition Receptors* exprimés par les DC cutanées est primordiale pour appréhender leur rôle dans l'immunité de la peau. Ce rôle est dépendant d'autres facteurs, tels que l'activation d'autres cellules de l'environnement tissulaire épithélial ou stromal mais également des pathogènes et de leur mode d'infection. Cette coopération multipartite permet d'engager la réponse la plus adaptée à chaque infection. Ainsi, le développement de stratégies d'immunothérapie préventives ou curatives ciblant les DC cutanées devra prendre en compte l'intégralité des facteurs nécessaires à la mise en place de la réponse immunitaire efficace et éviter de se focaliser sur le rôle individuel des DC.

En application de ces études, dans la dernière partie de ce travail, nous nous sommes intéressées plus particulièrement à un type d'infection virale, l'infection par le VIH intervenant au niveau des muqueuses génitales. A l'aide d'un modèle de muqueuse vaginale reconstruite, nous avons démontré, pour la première fois, que le VIH libre ne transcytose pas à travers une muqueuse pluristratifiée. Cependant, le virus pourrait être pris en charge et disséminé par des CL et des LT intra-épithéliaux. Par ailleurs et de façon surprenante, des cellules mononucléées infectées, telles que celles retrouvées dans le sperme de patients infectés, semblent transmigrer à travers la muqueuse et ainsi être impliquées dans le passage du VIH. Ainsi, la transmission du VIH à travers la muqueuse vaginale impliquerait différents types cellulaires. Néanmoins, les mécanismes précis, propres à ces différents types cellulaires, sont encore largement inconnus.

Les stratégies mises au point pour prévenir cette transmission vaginale, telles que les microbicides, devraient alors utiliser des combinaisons de molécules ciblant des cellules et des étapes différentes de l'entrée virale. Par ailleurs, de nouveaux modèles tridimensionnels de muqueuses humaines, tels que la muqueuse vaginale que nous avons reconstruit, permettant de tester l'efficacité et la toxicité de ces microbicides sur la muqueuse génitale féminine, sont essentiels pour garantir le devenir de ces stratégies si prometteuses.

Références

- Abadie, V., Badell, E., Douillard, P., Ensergueix, D., Leenen, P. J., Tanguy, M., Fiette, L., Saeland, S., Gicquel, B. and Winter, N. (2005). Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after Mycobacterium bovis BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. *Blood* **106**, 1843-50.
- Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K. T., Xu, S., Hobbs, H. H. and Krieger, M. (1996). Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* **271**, 518-20.
- Acton, S. L., Scherer, P. E., Lodish, H. F. and Krieger, M. (1994). Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J Biol Chem* **269**, 21003-9.
- Adachi, H., Tsujimoto, M., Arai, H. and Inoue, K. (1997). Expression cloning of a novel scavenger receptor from human endothelial cells. *J Biol Chem* **272**, 31217-20.
- Agace, W. W., Amara, A., Roberts, A. I., Pablos, J. L., Thelen, S., Ugucioni, M., Li, X. Y., Marsal, J., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T. et al. (2000). Constitutive expression of stromal derived factor-1 by mucosal epithelia and its role in HIV transmission and propagation. *Curr Biol* **10**, 325-8.
- Agrawal, S., Agrawal, A., Doughty, B., Gerwitz, A., Blenis, J., Van Dyke, T. and Pulendran, B. (2003). Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol* **171**, 4984-9.
- Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801.
- Albiger, B., Dahlberg, S., Henriques-Normark, B. and Normark, S. (2007). Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *J Intern Med* **261**, 511-28.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. and Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732-8.
- Alfsen, A. and Bomsel, M. (2002). HIV-1 gp41 envelope residues 650-685 exposed on native virus act as a lectin to bind epithelial cell galactosyl ceramide. *J Biol Chem* **277**, 25649-59.
- Alfsen, A., Yu, H., Magerus-Chatinet, A., Schmitt, A. and Bomsel, M. (2005). HIV-1-infected blood mononuclear cells form an integrin- and agrin-dependent viral synapse to induce efficient HIV-1 transcytosis across epithelial cell monolayer. *Mol Biol Cell* **16**, 4267-79.
- Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C. C., Feng, Y., Kennedy, P. E., Murphy, P. M. and Berger, E. A. (1996). CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **272**, 1955-8.
- Allan, R. S., Smith, C. M., Belz, G. T., van Lint, A. L., Wakim, L. M., Heath, W. R. and Carbone, F. R. (2003). Epidermal viral immunity induced by CD8alpha+ dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science* **301**, 1925-8.
- Allan, R. S., Waithman, J., Bedoui, S., Jones, C. M., Villadangos, J. A., Zhan, Y., Lew, A. M., Shortman, K., Heath, W. R. and Carbone, F. R. (2006). Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming. *Immunity* **25**, 153-62.
- Alvarez, C. P., Lasala, F., Carrillo, J., Muniz, O., Corbi, A. L. and Delgado, R. (2002). C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans. *J Virol* **76**, 6841-4.
- Amara, A., Gall, S. L., Schwartz, O., Salamero, J., Montes, M., Loetscher, P., Baggiolini, M., Virelizier, J. L. and Arenzana-Seisdedos, F. (1997). HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1alpha-dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication. *J Exp Med* **186**, 139-46.
- Amaral, E., Perdigao, A., Souza, M. H., Mauck, C., Waller, D., Zaneveld, L. and Faundes, A. (2006). Vaginal safety after use of a bioadhesive, acid-buffering, microbicidal contraceptive gel (ACIDFORM) and a 2% nonoxynol-9 product. *Contraception* **73**, 542-7.
- Amiel, E., Nicholson-Dykstra, S., Walters, J. J., Higgs, H. and Berwin, B. (2007). Scavenger receptor-A functions in phagocytosis of E. coli by bone marrow dendritic cells. *Exp Cell Res* **313**, 1438-48.
- Andersen-Nissen, E., Smith, K. D., Bonneau, R., Strong, R. K. and Aderem, A. (2007). A conserved surface on Toll-like receptor 5 recognizes bacterial flagellin. *J Exp Med* **204**, 393-403.
- Andoniou, C. E., van Dommelen, S. L., Voigt, V., Andrews, D. M., Brizard, G., Asselin-Paturel, C., Delale, T., Stacey, K. J., Trinchieri, G. and Degli-Esposti, M. A. (2005). Interaction between conventional dendritic cells and natural killer cells is integral to the activation of effective antiviral immunity. *Nat Immunol* **6**, 1011-9.
- Andras, I. E., Pu, H., Deli, M. A., Nath, A., Hennig, B. and Toborek, M. (2003). HIV-1 Tat protein alters tight junction protein expression and distribution in cultured brain endothelial cells. *J Neurosci Res* **74**, 255-65.

- Andras, I. E., Pu, H., Tian, J., Deli, M. A., Nath, A., Hennig, B. and Toborek, M.** (2005). Signaling mechanisms of HIV-1 Tat-induced alterations of claudin-5 expression in brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab* **25**, 1159-70.
- Andrejeva, J., Childs, K. S., Young, D. F., Carlos, T. S., Stock, N., Goodbourn, S. and Randall, R. E.** (2004). The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17264-9.
- Andrieu, M., Desoutter, J. F., Loing, E., Gaston, J., Hanau, D., Guillet, J. G. and Hosmalin, A.** (2003). Two human immunodeficiency virus vaccinal lipopeptides follow different cross-presentation pathways in human dendritic cells. *J Virol* **77**, 1564-70.
- Angel, C. E., George, E., Brooks, A. E., Ostrovsky, L. L., Brown, T. L. and Dunbar, P. R.** (2006). Cutting edge: CD1a+ antigen-presenting cells in human dermis respond rapidly to CCR7 ligands. *J Immunol* **176**, 5730-4.
- Angel, C. E., George, E., Ostrovsky, L. L. and Dunbar, P. R.** (2007). Comprehensive analysis of MHC-II expression in healthy human skin. *Immunol Cell Biol* **85**, 363-9.
- Annunziato, F., Cosmi, L., Santarlasci, V., Maggi, L., Liotta, F., Mazzinghi, B., Parente, E., Fili, L., Ferri, S., Frosali, F. et al.** (2007). Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* **204**, 1849-61.
- Ardavin, C., Wu, L., Li, C. L. and Shortman, K.** (1993). Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* **362**, 761-3.
- Ariizumi, K., Shen, G. L., Shikano, S., Xu, S., Ritter, R., 3rd, Kumamoto, T., Edelbaum, D., Morita, A., Bergstresser, P. R. and Takashima, A.** (2000). Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *J Biol Chem* **275**, 20157-67.
- Arredouani, M., Yang, Z., Ning, Y., Qin, G., Soininen, R., Tryggvason, K. and Kobzik, L.** (2004). The scavenger receptor MARCO is required for lung defense against pneumococcal pneumonia and inhaled particles. *J Exp Med* **200**, 267-72.
- Arredouani, M. S., Palecanda, A., Koziel, H., Huang, Y. C., Imrich, A., Sulahian, T. H., Ning, Y. Y., Yang, Z., Pikkarainen, T., Sankala, M. et al.** (2005). MARCO is the major binding receptor for unopsonized particles and bacteria on human alveolar macrophages. *J Immunol* **175**, 6058-64.
- Arrighi, J. F., Hauser, C., Chapuis, B., Zubler, R. H. and Kindler, V.** (1999). Long-term culture of human CD34(+) progenitors with FLT3-ligand, thrombopoietin, and stem cell factor induces extensive amplification of a CD34(-)CD14(-) and a CD34(-)CD14(+) dendritic cell precursor. *Blood* **93**, 2244-52.
- Arrighi, J. F., Pion, M., Garcia, E., Escola, J. M., van Kooyk, Y., Geijtenbeek, T. B. and Piguet, V.** (2004a). DC-SIGN-mediated infectious synapse formation enhances X4 HIV-1 transmission from dendritic cells to T cells. *J Exp Med* **200**, 1279-88.
- Arrighi, J. F., Pion, M., Wiznerowicz, M., Geijtenbeek, T. B., Garcia, E., Abraham, S., Leuba, F., Dutoit, V., Ducrey-Rundquist, O., van Kooyk, Y. et al.** (2004b). Lentivirus-mediated RNA interference of DC-SIGN expression inhibits human immunodeficiency virus transmission from dendritic cells to T cells. *J Virol* **78**, 10848-55.
- Aurrand-Lions, M., Johnson-Leger, C., Wong, C., Du Pasquier, L. and Imhof, B. A.** (2001). Heterogeneity of endothelial junctions is reflected by differential expression and specific subcellular localization of the three JAM family members. *Blood* **98**, 3699-707.
- Aurrand-Lions, M., Lamagna, C., Dangerfield, J. P., Wang, S., Herrera, P., Nourshargh, S. and Imhof, B. A.** (2005). Junctional adhesion molecule-C regulates the early influx of leukocytes into tissues during inflammation. *J Immunol* **174**, 6406-15.
- Auvert, B., Buve, A., Lagarde, E., Kahindo, M., Chege, J., Rutenberg, N., Musonda, R., Laourou, M., Akam, E. and Weiss, H. A.** (2001). Male circumcision and HIV infection in four cities in sub-Saharan Africa. *Aids* **15 Suppl 4**, S31-40.
- Auvert, B., Taljaard, D., Lagarde, E., Sobngwi-Tambekou, J., Sitta, R. and Puren, A.** (2005). Randomized, controlled intervention trial of male circumcision for reduction of HIV infection risk: the ANRS 1265 Trial. *PLoS Med* **2**, e298.
- Ayehunie, S., Cannon, C., Lamore, S., Kubilus, J., Anderson, D. J., Pudney, J. and Klausner, M.** (2006). Organotypic human vaginal-ectocervical tissue model for irritation studies of spermicides, microbicides, and feminine-care products. *Toxicol In Vitro* **20**, 689-98.

- Baba, M., Nishimura, O., Kanzaki, N., Okamoto, M., Sawada, H., Iizawa, Y., Shiraishi, M., Aramaki, Y., Okonogi, K., Ogawa, Y. et al. (1999). A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5698-703.
- Bailey, R. C., Moses, S., Parker, C. B., Agot, K., Maclean, I., Krieger, J. N., Williams, C. F., Campbell, R. T. and Ndinya-Achola, J. O. (2007). Male circumcision for HIV prevention in young men in Kisumu, Kenya: a randomised controlled trial. *Lancet* **369**, 643-56.
- Bajtay, Z., Speth, C., Erdei, A. and Dierich, M. P. (2004). Cutting edge: productive HIV-1 infection of dendritic cells via complement receptor type 3 (CR3, CD11b/CD18). *J Immunol* **173**, 4775-8.
- Bakri, Y., Schiffer, C., Zennou, V., Charneau, P., Kahn, E., Benjouad, A., Gluckman, J. C. and Canque, B. (2001). The maturation of dendritic cells results in postintegration inhibition of HIV-1 replication. *J Immunol* **166**, 3780-8.
- Balotta, C., Bagnarelli, P., Violin, M., Ridolfo, A. L., Zhou, D., Berlusconi, A., Corvasce, S., Corbellino, M., Clementi, M., Clerici, M. et al. (1997). Homozygous delta 32 deletion of the CCR-5 chemokine receptor gene in an HIV-1-infected patient. *Aids* **11**, F67-71.
- Balzarini, J. and Van Damme, L. (2007). Microbicide drug candidates to prevent HIV infection. *Lancet* **369**, 787-97.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B. and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18**, 767-811.
- Bangert, C., Friedl, J., Stary, G., Stingl, G. and Kopp, T. (2003). Immunopathologic features of allergic contact dermatitis in humans: participation of plasmacytoid dendritic cells in the pathogenesis of the disease? *J Invest Dermatol* **121**, 1409-18.
- Baratin, M., Roetynck, S., Lepolard, C., Falk, C., Sawadogo, S., Uematsu, S., Akira, S., Ryffel, B., Tiraby, J. G., Alexopoulou, L. et al. (2005). Natural killer cell and macrophage cooperation in MyD88-dependent innate responses to Plasmodium falciparum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14747-52.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C. et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-71.
- Barton, E. S., Forrest, J. C., Connolly, J. L., Chappell, J. D., Liu, Y., Schnell, F. J., Nusrat, A., Parkos, C. A. and Dermody, T. S. (2001). Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus. *Cell* **104**, 441-51.
- Bartosch, B., Vitelli, A., Granier, C., Goujon, C., Dubuisson, J., Pascale, S., Scarselli, E., Cortese, R., Nicosia, A. and Cosset, F. L. (2003). Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J Biol Chem* **278**, 41624-30.
- Bauer, S., Kirschning, C. J., Hacker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H. and Lipford, G. B. (2001). Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9237-42.
- Bazzoni, G., Martinez-Estrada, O. M., Orsenigo, F., Cordenonsi, M., Citi, S. and Dejana, E. (2000). Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J Biol Chem* **275**, 20520-6.
- Beaulieu, S., Kessous, A., Landry, D., Montplaisir, S., Bergeron, D. and Cohen, E. A. (1996). In vitro characterization of purified human thymic dendritic cells infected with human immunodeficiency virus type 1. *Virology* **222**, 214-26.
- Bechetoille, N., J., V., F., G., Dumont, S., Marechal, S., Gofflo, S., Andre, V., Schmitt, D., Perrier, E. and C., D. (2003). IL13 is more efficient than IL4 for recruiting langerhans cell precursors from peripheral blood monocytes. *Exogenous Dermatol* **1**, 279-289.
- Becker, M., Cotena, A., Gordon, S. and Platt, N. (2006). Expression of the class A macrophage scavenger receptor on specific subpopulations of murine dendritic cells limits their endotoxin response. *Eur J Immunol* **36**, 950-60.
- Beignon, A. S., McKenna, K., Skoberne, M., Manches, O., DaSilva, I., Kavanagh, D. G., Larsson, M., Gorelick, R. J., Lifson, J. D. and Bhardwaj, N. (2005). Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J Clin Invest* **115**, 3265-75.
- Bell, E., Ivarsson, B. and Merrill, C. (1979). Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 1274-8.
- Belsito, D. V., Sanchez, M. R., Baer, R. L., Valentine, F. and Thorbecke, G. J. (1984). Reduced Langerhans' cell Ia antigen and ATPase activity in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* **310**, 1279-82.

- Bendriess-Vermare, N., Barthelemy, C., Durand, I., Bruand, C., Dezutter-Dambuyant, C., Moulian, N., Berrih-Aknin, S., Caux, C., Trinchieri, G. and Briere, F.** (2001). Human thymus contains IFN-alpha-producing CD11c(-), myeloid CD11c(+), and mature interdigitating dendritic cells. *J Clin Invest* **107**, 835-44.
- Bennett, C. L., van Rijn, E., Jung, S., Inaba, K., Steinman, R. M., Kapsenberg, M. L. and Clausen, B. E.** (2005). Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity. *J Cell Biol* **169**, 569-76.
- Berger, E. A., Doms, R. W., Fenyo, E. M., Korber, B. T., Littman, D. R., Moore, J. P., Sattentau, Q. J., Schuitemaker, H., Sodroski, J. and Weiss, R. A.** (1998). A new classification for HIV-1. *Nature* **391**, 240.
- Berger, E. A., Murphy, P. M. and Farber, J. M.** (1999). Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* **17**, 657-700.
- Berlier, W., Bourlet, T., Lawrence, P., Hamzeh, H., Lambert, C., Genin, C., Verrier, B., Dieu-Nosjean, M. C., Pozzetto, B. and Delezay, O.** (2005). Selective sequestration of X4 isolates by human genital epithelial cells: Implication for virus tropism selection process during sexual transmission of HIV. *J Med Virol* **77**, 465-74.
- Berwin, B., Delneste, Y., Lovingood, R. V., Post, S. R. and Pizzo, S. V.** (2004). SREC-I, a type F scavenger receptor, is an endocytic receptor for calreticulin. *J Biol Chem* **279**, 51250-7.
- Berwin, B., Hart, J. P., Rice, S., Gass, C., Pizzo, S. V., Post, S. R. and Nicchitta, C. V.** (2003). Scavenger receptor-A mediates gp96/GRP94 and calreticulin internalization by antigen-presenting cells. *Embo J* **22**, 6127-36.
- Bevan, M. J.** (1976). Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med* **143**, 1283-8.
- Bhat, S., Spitalnik, S. L., Gonzalez-Scarano, F. and Silberberg, D. H.** (1991). Galactosyl ceramide or a derivative is an essential component of the neural receptor for human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7131-4.
- Bianchi, V., Maconi, G., Ardizzone, S., Colombo, E., Ferrara, E., Russo, A., Tenchini, M. L. and Porro, G. B.** (2007). Association of NOD2/CARD15 mutations on Crohn's disease phenotype in an Italian population. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **19**, 217-23.
- Birbeck, M. S., Breathnach, A. S. and Everall, J. D.** (1961). An electron microscope study of basal melanocytes and high-level clear cells (Langerhans cells) in vitiligo. *J Invest Dermatol* **37**, 51-64.
- Biti, R., Ffrench, R., Young, J., Bennetts, B., Stewart, G. and Liang, T.** (1997). HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 deletion allele. *Nat Med* **3**, 252-3.
- Bjorck, P., Flores-Romo, L. and Liu, Y. J.** (1997). Human interdigitating dendritic cells directly stimulate CD40-activated naive B cells. *Eur J Immunol* **27**, 1266-74.
- Blachere, N. E., Darnell, R. B. and Albert, M. L.** (2005). Apoptotic cells deliver processed antigen to dendritic cells for cross-presentation. *PLoS Biol* **3**, e185.
- Blaauvelt, A., Katz, S. I. and Udey, M. C.** (1995). Human Langerhans cells express E-cadherin. *J Invest Dermatol* **104**, 293-6.
- Bobardt, M. D., Chatterji, U., Selvarajah, S., Van der Schueren, B., David, G., Kahn, B. and Gally, P. A.** (2007). Cell-free human immunodeficiency virus type 1 transcytosis through primary genital epithelial cells. *J Virol* **81**, 395-405.
- Bocharov, A. V., Baranova, I. N., Vishnyakova, T. G., Remaley, A. T., Csako, G., Thomas, F., Patterson, A. P. and Eggerman, T. L.** (2004). Targeting of scavenger receptor class B type I by synthetic amphipathic alpha-helical-containing peptides blocks lipopolysaccharide (LPS) uptake and LPS-induced pro-inflammatory cytokine responses in THP-1 monocyte cells. *J Biol Chem* **279**, 36072-82.
- Boggiano, C., Manel, N. and Littman, D. R.** (2007). Dendritic cell-mediated trans-enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infectivity is independent of DC-SIGN. *J Virol* **81**, 2519-23.
- Bogunovic, M., Ginhoux, F., Wagers, A., Loubreau, M., Isola, L. M., Lubrano, L., Najfeld, V., Phelps, R. G., Grosskreutz, C., Scigliano, E. et al.** (2006). Identification of a radio-resistant and cycling dermal dendritic cell population in mice and men. *J Exp Med* **203**, 2627-38.
- Bomsel, M.** (1997). Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat Med* **3**, 42-7.
- Borkowski, T. A., Letterio, J. J., Farr, A. G. and Udey, M. C.** (1996). A role for endogenous transforming growth factor beta 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor beta 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* **184**, 2417-22.
- Bosnjak, L., Miranda-Saksena, M., Koelle, D. M., Boadle, R. A., Jones, C. A. and Cunningham, A. L.** (2005). Herpes simplex virus infection of human dendritic cells induces apoptosis and allows cross-presentation via uninfected dendritic cells. *J Immunol* **174**, 2220-7.
- Bouhlal, H., Chomont, N., Haeffner-Cavaillon, N., Kazatchkine, M. D., Belec, L. and Hocini, H.** (2002). Opsonization of HIV-1 by semen complement enhances infection of human epithelial cells. *J Immunol* **169**, 3301-6.

Bouhhal, H., Chomont, N., Requena, M., Nasreddine, N., Saidi, H., Legoff, J., Kazatchkine, M. D., Belec, L. and Hocini, H. (2007). Opsonization of HIV with complement enhances infection of dendritic cells and viral transfer to CD4 T cells in a CR3 and DC-SIGN-dependent manner. *J Immunol* **178**, 1086-95.

Bourinbaïar, A. S. and Phillips, D. M. (1991). Transmission of human immunodeficiency virus from monocytes to epithelia. *J Acquir Immune Defic Syndr* **4**, 56-63.

Boven, L. A., Middel, J., Verhoef, J., De Groot, C. J. and Nottet, H. S. (2000). Monocyte infiltration is highly associated with loss of the tight junction protein zonula occludens in HIV-1-associated dementia. *Neuropathol Appl Neurobiol* **26**, 356-60.

Boyd, M. R., Gustafson, K. R., McMahon, J. B., Shoemaker, R. H., O'Keefe, B. R., Mori, T., Gulakowski, R. J., Wu, L., Rivera, M. I., Laurencot, C. M. et al. (1997). Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus-inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120: potential applications to microbicide development. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 1521-30.

Braat, H., Stokkers, P., Hommes, T., Cohn, D., Vogels, E., Pronk, I., Spek, A., van Kampen, A., van Deventer, S., Peppelenbosch, M. et al. (2005). Consequence of functional Nod2 and Tlr4 mutations on gene transcription in Crohn's disease patients. *J Mol Med* **83**, 601-9.

Brandner, J. M., Kief, S., Grund, C., Rendl, M., Houdek, P., Kuhn, C., Tschachler, E., Franke, W. W. and Moll, I. (2002). Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. *Eur J Cell Biol* **81**, 253-63.

Brigl, M. and Brenner, M. B. (2004). CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol* **22**, 817-90.

Brown, G. D. and Gordon, S. (2001). Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* **413**, 36-7.

Brown, G. D., Herre, J., Williams, D. L., Willment, J. A., Marshall, A. S. and Gordon, S. (2003). Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med* **197**, 1119-24.

Brown, G. D., Taylor, P. R., Reid, D. M., Willment, J. A., Williams, D. L., Martinez-Pomares, L., Wong, S. Y. and Gordon, S. (2002). Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J Exp Med* **196**, 407-12.

Buechler, C., Ritter, M., Quoc, C. D., Agildere, A. and Schmitz, G. (1999). Lipopolysaccharide inhibits the expression of the scavenger receptor Cla-1 in human monocytes and macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **262**, 251-4.

Bulut, Y., Faure, E., Thomas, L., Equils, O. and Arditi, M. (2001). Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 signaling. *J Immunol* **167**, 987-94.

Burgdorf, S., Lukacs-Kornek, V. and Kurts, C. (2006). The mannose receptor mediates uptake of soluble but not of cell-associated antigen for cross-presentation. *J Immunol* **176**, 6770-6.

Burleigh, L., Lozach, P. Y., Schiffer, C., Staropoli, I., Pezo, V., Porrot, F., Canque, B., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F. and Amara, A. (2006). Infection of dendritic cells (DCs), not DC-SIGN-mediated internalization of human immunodeficiency virus, is required for long-term transfer of virus to T cells. *J Virol* **80**, 2949-57.

Burton, D. R., Pyati, J., Koduri, R., Sharp, S. J., Thornton, G. B., Parren, P. W., Sawyer, L. S., Hendry, R. M., Dunlop, N., Nara, P. L. et al. (1994). Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody. *Science* **266**, 1024-7.

Burzyn, D., Rassa, J. C., Kim, D., Nepomnaschy, I., Ross, S. R. and Piazzon, I. (2004). Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by a retrovirus. *J Virol* **78**, 576-84.

-C-

Calvo, D., Gomez-Coronado, D., Lasuncion, M. A. and Vega, M. A. (1997). CLA-1 is an 85-kD plasma membrane glycoprotein that acts as a high-affinity receptor for both native (HDL, LDL, and VLDL) and modified (OxLDL and AcLDL) lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 2341-9.

Cambi, A., Gijzen, K., de Vries, J. M., Torensma, R., Joosten, B., Adema, G. J., Netea, M. G., Kullberg, B. J., Romani, L. and Figdor, C. G. (2003). The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Eur J Immunol* **33**, 532-8.

Cameron, P. U., Forsum, U., Tepler, H., Granelli-Piperno, A. and Steinman, R. M. (1992a). During HIV-1 infection most blood dendritic cells are not productively infected and can induce allogeneic CD4+ T cells clonal expansion. *Clin Exp Immunol* **88**, 226-36.

- Cameron, P. U., Freudenthal, P. S., Barker, J. M., Gezelter, S., Inaba, K. and Steinman, R. M.** (1992b). Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4+ T cells. *Science* **257**, 383-7.
- Canque, B., Bakri, Y., Camus, S., Yagello, M., Benjouad, A. and Gluckman, J. C.** (1999). The susceptibility to X4 and R5 human immunodeficiency virus-1 strains of dendritic cells derived in vitro from CD34(+) hematopoietic progenitor cells is primarily determined by their maturation stage. *Blood* **93**, 3866-75.
- Cao, T., Ueno, H., Glaser, C., Fay, J. W., Palucka, A. K. and Banchereau, J.** (2007). Both Langerhans cells and interstitial DC cross-present melanoma antigens and efficiently activate antigen-specific CTL. *Eur J Immunol*.
- Carreno, M. P., Chomont, N., Kazatchkine, M. D., Irinopoulou, T., Krief, C., Mohamed, A. S., Andreoletti, L., Matta, M. and Belec, L.** (2002). Binding of LFA-1 (CD11a) to intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3; CD50) and ICAM-2 (CD102) triggers transmigration of human immunodeficiency virus type 1-infected monocytes through mucosal epithelial cells. *J Virol* **76**, 32-40.
- Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D. and Banchereau, J.** (1992). GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* **360**, 258-61.
- Caux, C., Massacrier, C., Dubois, B., Valladeau, J., Dezutter-Dambuyant, C., Durand, I., Schmitt, D. and Saeland, S.** (1999). Respective involvement of TGF-beta and IL-4 in the development of Langerhans cells and non-Langerhans dendritic cells from CD34+ progenitors. *J Leukoc Biol* **66**, 781-91.
- Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Dezutter-Dambuyant, C., de Saint-Vis, B., Jacquet, C., Yoneda, K., Imamura, S., Schmitt, D. and Banchereau, J.** (1996a). CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med* **184**, 695-706.
- Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Durand, I. and Banchereau, J.** (1996b). Interleukin-3 cooperates with tumor necrosis factor alpha for the development of human dendritic/Langerhans cells from cord blood CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* **87**, 2376-85.
- Cavrois, M., Neidleman, J., Kreisberg, J. F., Fenard, D., Callebaut, C. and Greene, W. C.** (2006). Human immunodeficiency virus fusion to dendritic cells declines as cells mature. *J Virol* **80**, 1992-9.
- Cerio, R., Griffiths, C. E., Cooper, K. D., Nickoloff, B. J. and Headington, J. T.** (1989). Characterization of factor XIIIa positive dermal dendritic cells in normal and inflamed skin. *Br J Dermatol* **121**, 421-31.
- Charbonnier, A. S., Mallet, F., Fiers, M. M., Desgranges, C., Dezutter-Dambuyant, C. and Schmitt, D.** (1995). In vitro HIV-1 infection of isolated epidermal Langerhans cells with a cell-free system. *Adv Exp Med Biol* **378**, 465-8.
- Charbonnier, A. S., Verrier, B., Jacquet, C., Massacrier, C., Fiers, M. M., Mallet, F., Dezutter-Dambuyant, C. and Schmitt, D.** (1996). In vitro HIV1 infection of CD34+ progenitor-derived dendritic/Langerhans cells at different stages of their differentiation in the presence of GM-CSF/TNF alpha. *Res Virol* **147**, 89-95.
- Chen, H., Yuan, J., Wang, Y. and Silvers, W. K.** (1985). Distribution of ATPase-positive Langerhans cells in normal adult human skin. *Br J Dermatol* **113**, 707-11.
- Cheshenko, N., Keller, M. J., MasCasullo, V., Jarvis, G. A., Cheng, H., John, M., Li, J. H., Hogarty, K., Anderson, R. A., Waller, D. P. et al.** (2004). Candidate topical microbicides bind herpes simplex virus glycoprotein B and prevent viral entry and cell-to-cell spread. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 2025-36.
- Chiu, Y. L., Soros, V. B., Kreisberg, J. F., Stopak, K., Yonemoto, W. and Greene, W. C.** (2005). Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells. *Nature* **435**, 108-14.
- Cho, K. H., Ahn, H. T., Park, K. C., Chung, J. H., Kim, S. W., Sung, M. W., Kim, K. H., Chung, P. H., Eun, H. C. and Youn, J. I.** (2000). Reconstruction of human hard-palate mucosal epithelium on de-epidermized dermis. *J Dermatol Sci* **22**, 117-24.
- Choe, H., Farzan, M., Konkel, M., Martin, K., Sun, Y., Marcon, L., Cayabyab, M., Berman, M., Dorf, M. E., Gerard, N. et al.** (1998). The orphan seven-transmembrane receptor apj supports the entry of primary T-cell-line-tropic and dualtropic human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **72**, 6113-8.
- Choe, H., Farzan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P. D., Wu, L., Mackay, C. R., LaRosa, G., Newman, W. et al.** (1996). The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* **85**, 1135-48.
- Chung, J. H., Cho, K. H., Lee, D. Y., Kwon, O. S., Sung, M. W., Kim, K. H. and Eun, H. C.** (1997). Human oral buccal mucosa reconstructed on dermal substrates: a model for oral epithelial differentiation. *Arch Dermatol Res* **289**, 677-85.
- Cimarelli, A., Zambruno, G., Marconi, A., Girolomoni, G., Bertazzoni, U. and Giannetti, A.** (1994). Quantitation by competitive PCR of HIV-1 proviral DNA in epidermal Langerhans cells of HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* **7**, 230-5.
- Claude, P.** (1978). Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens. *J Membr Biol* **39**, 219-32.

- Cocchi, F., DeVico, A. L., Garzino-Demo, A., Arya, S. K., Gallo, R. C. and Lusso, P.** (1995). Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* **270**, 1811-5.
- Collins, K. B., Patterson, B. K., Naus, G. J., Landers, D. V. and Gupta, P.** (2000). Development of an in vitro organ culture model to study transmission of HIV-1 in the female genital tract. *Nat Med* **6**, 475-9.
- Combadiere, C., Gao, J., Tiffany, H. L. and Murphy, P. M.** (1998). Gene cloning, RNA distribution, and functional expression of mCX3CR1, a mouse chemotactic receptor for the CX3C chemokine fractalkine. *Biochem Biophys Res Commun* **253**, 728-32.
- Compton, T., Kurt-Jones, E. A., Boehme, K. W., Belko, J., Latz, E., Golenbock, D. T. and Finberg, R. W.** (2003). Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol* **77**, 4588-96.
- Cordenonsi, M., D'Atri, F., Hammar, E., Parry, D. A., Kendrick-Jones, J., Shore, D. and Citi, S.** (1999). Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin. *J Cell Biol* **147**, 1569-82.
- Crabb, C.** (2006). GlaxoSmithKline ends aplaviroc trials. *Aids* **20**, 641.
- Creagh, E. M. and O'Neill, L. A.** (2006). TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that cooperate in innate immunity. *Trends Immunol* **27**, 352-7.
- Cremel, M., Berlier, W., Hamzeh, H., Cognasse, F., Lawrence, P., Genin, C., Bernengo, J. C., Lambert, C., Dieu-Nosjean, M. C. and Delezay, O.** (2005). Characterization of CCL20 secretion by human epithelial vaginal cells: involvement in Langerhans cell precursor attraction. *J Leukoc Biol* **78**, 158-66.
- Cremel, M., Hamzeh-Cognasse, H., Genin, C. and Delezay, O.** (2006). Female genital tract immunization: evaluation of candidate immunoadjuvants on epithelial cell secretion of CCL20 and dendritic/Langerhans cell maturation. *Vaccine* **24**, 5744-54.
- Cresswell, P., Ackerman, A. L., Giodini, A., Peaper, D. R. and Wearsch, P. A.** (2005). Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunol Rev* **207**, 145-57.
- Curjel, T. J., Wei, S., Dong, H., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Krzysiek, R., Knutson, K. L., Daniel, B., Zimmermann, M. C. et al.** (2003). Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat Med* **9**, 562-7.
- Curtis, B. M., Scharnawske, S. and Watson, A. J.** (1992). Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 8356-60.

-D-

- D'Atri, F. and Citi, S.** (2001). Cingulin interacts with F-actin in vitro. *FEBS Lett* **507**, 21-4.
- D'Cruz, O. J., Erbeck, D. and Uckun, F. M.** (2006). Developmental safety profile of the anti-HIV agent stampidine in rabbits. *Arzneimittelforschung* **56**, 159-66.
- da Silva Correia, J., Soldau, K., Christen, U., Tobias, P. S. and Ulevitch, R. J.** (2001). Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J Biol Chem* **276**, 21129-35.
- Dahl, M., Bauer, A. K., Arredouani, M., Soininen, R., Tryggvason, K., Kleeberger, S. R. and Kobzik, L.** (2007). Protection against inhaled oxidants through scavenging of oxidized lipids by macrophage receptors MARCO and SR-AI/II. *J Clin Invest* **117**, 757-64.
- Dallasta, L. M., Pizarov, L. A., Esplen, J. E., Werley, J. V., Moses, A. V., Nelson, J. A. and Achim, C. L.** (1999). Blood-brain barrier tight junction disruption in human immunodeficiency virus-1 encephalitis. *Am J Pathol* **155**, 1915-27.
- Dani, A., Chaudhry, A., Mukherjee, P., Rajagopal, D., Bhatia, S., George, A., Bal, V., Rath, S. and Mayor, S.** (2004). The pathway for MHCII-mediated presentation of endogenous proteins involves peptide transport to the endo-lysosomal compartment. *J Cell Sci* **117**, 4219-30.
- Datta, S. K., Okamoto, S., Hayashi, T., Shin, S. S., Mihajlov, I., Fermin, A., Guiney, D. G., Fierer, J. and Raz, E.** (2006). Vaccination with irradiated *Listeria* induces protective T cell immunity. *Immunity* **25**, 143-52.
- de Fraissinette, A., Schmitt, D. and Thivolet, J.** (1989). Langerhans cells of human mucosa. *J Dermatol* **16**, 255-62.
- De Panfilis, G., Manara, G. C., Ferrari, C. and Torresani, C.** (1988). Simultaneous colloidal gold immunoelectronmicroscopy labeling of CD1a, HLA-DR, and CD4 surface antigens of human epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol* **91**, 547-52.

- De Panfilis, G., Manara, G. C., Ferrari, C. and Torresani, C.** (1991). Adhesion molecules on the plasma membrane of epidermal cells. III. Keratinocytes and Langerhans cells constitutively express the lymphocyte function-associated antigen 3. *J Invest Dermatol* **96**, 512-7.
- De Panfilis, G., Soligo, D., Manara, G. C., Ferrari, C. and Torresani, C.** (1989). Adhesion molecules on the plasma membrane of epidermal cells. I. Human resting Langerhans cells express two members of the adherence-promoting CD11/CD18 family, namely, H-Mac-1 (CD11b/CD18) and gp 150,95 (CD11c/CD18). *J Invest Dermatol* **93**, 60-9.
- De Panfilis, G., Soligo, D., Manara, G. C., Ferrari, C., Torresani, C. and Zucchi, A.** (1990). Human normal-resting epidermal Langerhans cells do express the type 3 complement receptor. *Br J Dermatol* **122**, 127-36.
- de Saint-Vis, B., Vincent, J., Vandenabeele, S., Vanbervliet, B., Pin, J. J., Ait-Yahia, S., Patel, S., Mattei, M. G., Banchereau, J., Zurawski, S. et al.** (1998). A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity* **9**, 325-36.
- de Witte, L., Nabatov, A., Pion, M., Fluitsma, D., de Jong, M. A., de Gruijl, T., Piguët, V., van Kooyk, Y. and Geijtenbeek, T. B.** (2007). Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nat Med* **13**, 367-71.
- Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G. A., Smith, M. W., Allikmets, R., Goedert, J. J., Buchbinder, S. P., Vittinghoff, E., Gomperts, E. et al.** (1996). Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CKR5* structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* **273**, 1856-62.
- Delcourt-Huard, A., Corlu, A., Joffre, A., Magloire, H. and Bonnaure-Mallet, M.** (1997). Reconstituted human gingival epithelium: nonsubmerged in vitro model. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **33**, 30-6.
- Delibrias, C. C., Mouhoub, A., Fischer, E. and Kazatchkine, M. D.** (1994). CR1(CD35) and CR2(CD21) complement C3 receptors are expressed on normal human thymocytes and mediate infection of thymocytes with opsonized human immunodeficiency virus. *Eur J Immunol* **24**, 2784-8.
- Delneste, Y., Magistrelli, G., Gauchat, J., Haeuw, J., Aubry, J., Nakamura, K., Kawakami-Honda, N., Goetsch, L., Sawamura, T., Bonnefoy, J. et al.** (2002). Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity* **17**, 353-62.
- Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R. E., Hill, C. M. et al.** (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**, 661-6.
- Deng, H. K., Unutmaz, D., KewalRamani, V. N. and Littman, D. R.** (1997). Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature* **388**, 296-300.
- Derrick, E. K., Barker, J. N., Khan, A., Price, M. L. and Macdonald, D. M.** (1993). The tissue distribution of factor XIIIa positive cells. *Histopathology* **22**, 157-62.
- Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D. A., Dusserre, N., Hanau, D., Kolbe, H. V., Kieny, M. P., Cazenave, J. P., Schmitt, D., Pasquali, J. L., Olivier, R. et al.** (1991). Interaction of human epidermal Langerhans cells with HIV-1 viral envelope proteins (gp 120 and gp 160s) involves a receptor-mediated endocytosis independent of the CD4 T4A epitope. *J Dermatol* **18**, 377-92.
- Dezzutti, C. S., Guenther, P. C., Cummins, J. E., Jr., Cabrera, T., Marshall, J. H., Dillberger, A. and Lal, R. B.** (2001). Cervical and prostate primary epithelial cells are not productively infected but sequester human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* **183**, 1204-13.
- Dezzutti, C. S., James, V. N., Ramos, A., Sullivan, S. T., Siddig, A., Bush, T. J., Grohskopf, L. A., Paxton, L., Subbarao, S. and Hart, C. E.** (2004). In vitro comparison of topical microbicides for prevention of human immunodeficiency virus type 1 transmission. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 3834-44.
- Di Fabio, S., Giannini, G., Lapenta, C., Spada, M., Binelli, A., Germinario, E., Sestili, P., Belardelli, F., Proietti, E. and Vella, S.** (2001). Vaginal transmission of HIV-1 in hu-SCID mice: a new model for the evaluation of vaginal microbicides. *Aids* **15**, 2231-8.
- Di Fabio, S., Van Roey, J., Giannini, G., van den Mooter, G., Spada, M., Binelli, A., Pirillo, M. F., Germinario, E., Belardelli, F., de Bethune, M. P. et al.** (2003). Inhibition of vaginal transmission of HIV-1 in hu-SCID mice by the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor TMC120 in a gel formulation. *Aids* **17**, 1597-604.
- Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. and Reis e Sousa, C.** (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**, 1529-31.
- Dominguez-Soto, A., Aragonese-Fenoll, L., Martin-Gayo, E., Martinez-Prats, L., Colmenares, M., Naranjo-Gomez, M., Borrás, F. E., Munoz, P., Zubiaur, M., Toribio, M. L. et al.** (2007). The DC-SIGN-related lectin LSECtin mediates antigen capture and pathogen binding by human myeloid cells. *Blood* **109**, 5337-45.
- Donaghy, H., Gazzard, B., Gotch, F. and Patterson, S.** (2003). Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1. *Blood* **101**, 4505-11.

Donaghy, H., Pozniak, A., Gazzard, B., Qazi, N., Gilmour, J., Gotch, F. and Patterson, S. (2001). Loss of blood CD11c(+) myeloid and CD11c(-) plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. *Blood* **98**, 2574-6.

Donaghy, H., Wilkinson, J. and Cunningham, A. L. (2006). HIV interactions with dendritic cells: has our focus been too narrow? *J Leukoc Biol* **80**, 1001-12.

Dong, C. (2006). Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nat Rev Immunol* **6**, 329-33.

Dong, X., Storkus, W. J. and Salter, R. D. (1999). Binding and uptake of agalactosyl IgG by mannose receptor on macrophages and dendritic cells. *J Immunol* **163**, 5427-34.

Doranz, B. J., Rucker, J., Yi, Y., Smyth, R. J., Samson, M., Peiper, S. C., Parmentier, M., Collman, R. G. and Doms, R. W. (1996). A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* **85**, 1149-58.

Dorr, P., Westby, M., Dobbs, S., Griffin, P., Irvine, B., Macartney, M., Mori, J., Rickett, G., Smith-Burchnell, C., Napier, C. et al. (2005). Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 4721-32.

Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G. P., Martin, S. R., Huang, Y., Nagashima, K. A., Cayanan, C., Maddon, P. J., Koup, R. A., Moore, J. P. et al. (1996). HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* **381**, 667-73.

Drickamer, K. (1999). C-type lectin-like domains. *Curr Opin Struct Biol* **9**, 585-90.

Dubois, B., Barthelemy, C., Durand, I., Liu, Y. J., Caux, C. and Briere, F. (1999). Toward a role of dendritic cells in the germinal center reaction: triggering of B cell proliferation and isotype switching. *J Immunol* **162**, 3428-36.

Dumont, S., Valladeau, J., Bechemtoille, N., Gofflo, S., Marechal, S., Amara, A., Schmitt, D. and Dezutter-Dambuyant, C. (2004). When integrated in a subepithelial mucosal layer equivalent, dendritic cells keep their immature stage and their ability to replicate type R5 HIV type 1 strains in the absence of T cell subsets. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**, 383-97.

Dunne, D. W., Resnick, D., Greenberg, J., Krieger, M. and Joiner, K. A. (1994). The type I macrophage scavenger receptor binds to gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1863-7.

Dwinell, M. B., Eckmann, L., Leopard, J. D., Varki, N. M. and Kagnoff, M. F. (1999). Chemokine receptor expression by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **117**, 359-67.

Dzionic, A., Sohma, Y., Nagafune, J., Cella, M., Colonna, M., Facchetti, F., Gunther, G., Johnston, I., Lanzavecchia, A., Nagasaka, T. et al. (2001). BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med* **194**, 1823-34.

-E-

Ebner, S., Ehammer, Z., Holzmann, S., Schwingshackl, P., Forstner, M., Stoitzner, P., Huemer, G. M., Fritsch, P. and Romani, N. (2004). Expression of C-type lectin receptors by subsets of dendritic cells in human skin. *Int Immunol* **16**, 877-87.

Edinger, A. L., Hoffman, T. L., Sharron, M., Lee, B., O'Dowd, B. and Doms, R. W. (1998a). Use of GPR1, GPR15, and STRL33 as coreceptors by diverse human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus envelope proteins. *Virology* **249**, 367-78.

Edinger, A. L., Hoffman, T. L., Sharron, M., Lee, B., Yi, Y., Choe, W., Kolson, D. L., Mitrovic, B., Zhou, Y., Faulds, D. et al. (1998b). An orphan seven-transmembrane domain receptor expressed widely in the brain functions as a coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus. *J Virol* **72**, 7934-40.

Elder, J. T., Reynolds, N. J., Cooper, K. D., Griffiths, C. E., Hardas, B. D. and Bleicher, P. A. (1993). CD1 gene expression in human skin. *J Dermatol Sci* **6**, 206-13.

Elias, P. M., McNutt, N. S. and Friend, D. S. (1977). Membrane alterations during cornification of mammalian squamous epithelia: a freeze-fracture, tracer, and thin-section study. *Anat Rec* **189**, 577-94.

Elomaa, O., Kangas, M., Sahlberg, C., Tuukkanen, J., Sormunen, R., Liakka, A., Thesleff, I., Kraal, G. and Tryggvason, K. (1995). Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed in a subset of macrophages. *Cell* **80**, 603-9.

Elomaa, O., Sankala, M., Pikkarainen, T., Bergmann, U., Tuuttila, A., Raatikainen-Ahokas, A., Sariola, H. and Tryggvason, K. (1998). Structure of the human macrophage MARCO receptor and characterization of its bacteria-binding region. *J Biol Chem* **273**, 4530-8.

Elshourbagy, N. A., Li, X., Terrett, J., Vanhorn, S., Gross, M. S., Adamou, J. E., Anderson, K. M., Webb, C. L. and Lysko, P. G. (2000). Molecular characterization of a human scavenger receptor, human MARCO. *Eur J Biochem* **267**, 919-26.

Engering, A. J., Cella, M., Fluitsma, D., Brockhaus, M., Hoefsmit, E. C., Lanzavecchia, A. and Pieters, J. (1997). The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. *Eur J Immunol* **27**, 2417-25.

Evans, M. J., von Hahn, T., Tscherne, D. M., Syder, A. J., Panis, M., Wolk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J. A., Bieniasz, P. D. and Rice, C. M. (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* **446**, 801-5.

Ezekowitz, R. A., Sastry, K., Bailly, P. and Warner, A. (1990). Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *J Exp Med* **172**, 1785-94.

Ezekowitz, R. A., Williams, D. J., Koziel, H., Armstrong, M. Y., Warner, A., Richards, F. F. and Rose, R. M. (1991). Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. *Nature* **351**, 155-8.

-F-

Facciponte, J. G., Wang, X. Y. and Subject, J. R. (2007). Hsp110 and Grp170, members of the Hsp70 superfamily, bind to scavenger receptor-A and scavenger receptor expressed by endothelial cells-I. *Eur J Immunol*.

Fais, S., Capobianchi, M. R., Abbate, I., Castilletti, C., Gentile, M., Cordiali Fei, P., Ameglio, F. and Dianzani, F. (1995). Unidirectional budding of HIV-1 at the site of cell-to-cell contact is associated with co-polarization of intercellular adhesion molecules and HIV-1 viral matrix protein. *Aids* **9**, 329-35.

Fanning, A. S., Jameson, B. J., Jesaitis, L. A. and Anderson, J. M. (1998). The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* **273**, 29745-53.

Fantini, J., Cook, D. G., Nathanson, N., Spitalnik, S. L. and Gonzalez-Scarano, F. (1993). Infection of colonic epithelial cell lines by type 1 human immunodeficiency virus is associated with cell surface expression of galactosylceramide, a potential alternative gp120 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2700-4.

Fantini, J., Yahi, N. and Chermann, J. C. (1991). Human immunodeficiency virus can infect the apical and basolateral surfaces of human colonic epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9297-301.

Fantuzzi, L., Purificato, C., Donato, K., Belardelli, F. and Gessani, S. (2004). Human immunodeficiency virus type 1 gp120 induces abnormal maturation and functional alterations of dendritic cells: a novel mechanism for AIDS pathogenesis. *J Virol* **78**, 9763-72.

Farkas, L., Beiske, K., Lund-Johansen, F., Brandtzaeg, P. and Jahnsen, F. L. (2001). Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon- α /beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *Am J Pathol* **159**, 237-43.

Farzan, M., Choe, H., Martin, K., Marcon, L., Hofmann, W., Karlsson, G., Sun, Y., Barrett, P., Marchand, N., Sullivan, N. et al. (1997). Two orphan seven-transmembrane segment receptors which are expressed in CD4-positive cells support simian immunodeficiency virus infection. *J Exp Med* **186**, 405-11.

Faure, E., Equils, O., Sieling, P. A., Thomas, L., Zhang, F. X., Kirschning, C. J., Polentarutti, N., Muzio, M. and Arditi, M. (2000). Bacterial lipopolysaccharide activates NF-kappaB through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem* **275**, 11058-63.

Faure, E., Thomas, L., Xu, H., Medvedev, A., Equils, O. and Arditi, M. (2001). Bacterial lipopolysaccharide and IFN-gamma induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF-kappa B activation. *J Immunol* **166**, 2018-24.

Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E. and Berger, E. A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**, 872-7.

Ferlazzo, G., Pack, M., Thomas, D., Paludan, C., Schmid, D., Strowig, T., Bougras, G., Muller, W. A., Moretta, L. and Munz, C. (2004). Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16606-11.

- Fernandez, N. C., Lozier, A., Flament, C., Ricciardi-Castagnoli, P., Bellet, D., Suter, M., Perricaudet, M., Tursz, T., Maraskovsky, E. and Zitvogel, L.** (1999). Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med* **5**, 405-11.
- Ferwerda, G., Kullberg, B. J., de Jong, D. J., Girardin, S. E., Langenberg, D. M., van Crevel, R., Ottenhoff, T. H., Van der Meer, J. W. and Netea, M. G.** (2007). Mycobacterium paratuberculosis is recognized by Toll-like receptors and NOD2. *J Leukoc Biol*.
- Fichorova, R. N., Cronin, A. O., Lien, E., Anderson, D. J. and Ingalls, R. R.** (2002). Response to *Neisseria gonorrhoeae* by cervicovaginal epithelial cells occurs in the absence of toll-like receptor 4-mediated signaling. *J Immunol* **168**, 2424-32.
- Fichorova, R. N., Tucker, L. D. and Anderson, D. J.** (2001). The molecular basis of nonoxynol-9-induced vaginal inflammation and its possible relevance to human immunodeficiency virus type 1 transmission. *J Infect Dis* **184**, 418-28.
- Figdor, C. G., van Kooyk, Y. and Adema, G. J.** (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol* **2**, 77-84.
- Filgueira, L., Nestle, F. O., Rittig, M., Joller, H. I. and Groscurth, P.** (1996). Human dendritic cells phagocytose and process *Borrelia burgdorferi*. *J Immunol* **157**, 2998-3005.
- Fleming, D. T. and Wasserheit, J. N.** (1999). From epidemiological synergy to public health policy and practice: the contribution of other sexually transmitted diseases to sexual transmission of HIV infection. *Sex Transm Infect* **75**, 3-17.
- Fletcher, P., Kiselyeva, Y., Wallace, G., Romano, J., Griffin, G., Margolis, L. and Shattock, R.** (2005). The nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor UC-781 inhibits human immunodeficiency virus type 1 infection of human cervical tissue and dissemination by migratory cells. *J Virol* **79**, 11179-86.
- Fonteneau, J. F., Larsson, M., Beignon, A. S., McKenna, K., Dasilva, I., Amara, A., Liu, Y. J., Lifson, J. D., Littman, D. R. and Bhardwaj, N.** (2004). Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells. *J Virol* **78**, 5223-32.
- Fortin, J. F., Cantin, R., Lamontagne, G. and Tremblay, M.** (1997). Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity. *J Virol* **71**, 3588-96.
- Frank, I., Piatak, M., Jr., Stoessel, H., Romani, N., Bonnyay, D., Lifson, J. D. and Pope, M.** (2002). Infectious and whole inactivated simian immunodeficiency viruses interact similarly with primate dendritic cells (DCs): differential intracellular fate of virions in mature and immature DCs. *J Virol* **76**, 2936-51.
- Frank, I., Stoiber, H., Godar, S., Stockinger, H., Steindl, F., Katinger, H. W. and Dierich, M. P.** (1996). Acquisition of host cell-surface-derived molecules by HIV-1. *Aids* **10**, 1611-20.
- Freudenthal, P. S. and Steinman, R. M.** (1990). The distinct surface of human blood dendritic cells, as observed after an improved isolation method. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 7698-702.
- Fritz, J. H., Girardin, S. E., Fitting, C., Werts, C., Mengin-Lecreulx, D., Caroff, M., Cavillon, J. M., Philpott, D. J. and Adib-Conquy, M.** (2005). Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *Eur J Immunol* **35**, 2459-70.
- Furio, A. M., Cutrera, R. A., Castillo Thea, V., Perez Lloret, S., Riccio, P., Caccuri, R. L., Brusco, L. L. and Cardinali, D. P.** (2002). Effect of melatonin on changes in locomotor activity rhythm of Syrian hamsters injected with beta amyloid peptide 25-35 in the suprachiasmatic nuclei. *Cell Mol Neurobiol* **22**, 699-709.
- Furio, L., Berthier-Vergnes, O., Ducarre, B., Schmitt, D. and Peguet-Navarro, J.** (2005). UVA radiation impairs phenotypic and functional maturation of human dermal dendritic cells. *J Invest Dermatol* **125**, 1032-8.
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K. and Tsukita, S.** (1998a). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* **141**, 1539-50.
- Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H. and Tsukita, S.** (2001). Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol* **153**, 263-72.
- Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A. and Tsukita, S.** (2002). Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* **156**, 1099-111.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S. and Tsukita, S.** (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* **123**, 1777-88.
- Furuse, M., Itoh, M., Hirase, T., Nagafuchi, A., Yonemura, S. and Tsukita, S.** (1994). Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol* **127**, 1617-26.
- Furuse, M., Sasaki, H., Fujimoto, K. and Tsukita, S.** (1998b). A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol* **143**, 391-401.
- Furuse, M., Sasaki, H. and Tsukita, S.** (1999). Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol* **147**, 891-903.

- Gallay, P. (2004). Syndecans and HIV-1 pathogenesis. *Microbes Infect* **6**, 617-22.
- Gantner, B. N., Simmons, R. M. and Underhill, D. M. (2005). Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *Embo J* **24**, 1277-86.
- Garcia, E., Pion, M., Pelchen-Matthews, A., Collinson, L., Arrighi, J. F., Blot, G., Leuba, F., Escola, J. M., Demaurex, N., Marsh, M. et al. (2005). HIV-1 trafficking to the dendritic cell-T-cell infectious synapse uses a pathway of tetraspanin sorting to the immunological synapse. *Traffic* **6**, 488-501.
- Geijtenbeek, T. B., Krooshoop, D. J., Bleijs, D. A., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Grabovsky, V., Alon, R., Figdor, C. G. and van Kooyk, Y. (2000a). DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat Immunol* **1**, 353-7.
- Geijtenbeek, T. B., Kwon, D. S., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Middel, J., Cornelissen, I. L., Nottet, H. S., KewalRamani, V. N., Littman, D. R. et al. (2000b). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* **100**, 587-97.
- Geijtenbeek, T. B., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Adema, G. J., van Kooyk, Y. and Figdor, C. G. (2000c). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* **100**, 575-85.
- Geijtenbeek, T. B., Van Vliet, S. J., Koppel, E. A., Sanchez-Hernandez, M., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Appelmek, B. and Van Kooyk, Y. (2003). Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med* **197**, 7-17.
- Geissmann, F., Prost, C., Monnet, J. P., Dy, M., Brousse, N. and Hermine, O. (1998). Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. *J Exp Med* **187**, 961-6.
- Gerlini, G., Hefti, H. P., Kleinhans, M., Nickoloff, B. J., Burg, G. and Nestle, F. O. (2001). Cd1d is expressed on dermal dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells. *J Invest Dermatol* **117**, 576-82.
- Gibson, S. J., Lindh, J. M., Riter, T. R., Gleason, R. M., Rogers, L. M., Fuller, A. E., Oesterich, J. L., Gorden, K. B., Qiu, X., McKane, S. W. et al. (2002). Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod. *Cell Immunol* **218**, 74-86.
- Gill, G. A., Buda, A., Moorghen, M., Dettmar, P. W. and Pignatelli, M. (2005). Characterisation of adherens and tight junctional molecules in normal animal larynx; determining a suitable model for studying molecular abnormalities in human laryngopharyngeal reflux. *J Clin Pathol* **58**, 1265-70.
- Gilliet, M., Conrad, C., Geiges, M., Cozzio, A., Thurlimann, W., Burg, G., Nestle, F. O. and Dummer, R. (2004). Psoriasis triggered by toll-like receptor 7 agonist imiquimod in the presence of dermal plasmacytoid dendritic cell precursors. *Arch Dermatol* **140**, 1490-5.
- Ginhoux, F., Tacke, F., Angeli, V., Bogunovic, M., Loubeau, M., Dai, X. M., Stanley, E. R., Randolph, G. J. and Merad, M. (2006). Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol* **7**, 265-73.
- Girardin, S. E., Boneca, I. G., Carneiro, L. A., Antignac, A., Jehanno, M., Viala, J., Tedin, K., Taha, M. K., Labigne, A., Zahringer, U. et al. (2003a). Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* **300**, 1584-7.
- Girardin, S. E., Boneca, I. G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D. J. and Sansonetti, P. J. (2003b). Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* **278**, 8869-72.
- Gitlin, L., Barchet, W., Gilfillan, S., Cella, M., Beutler, B., Flavell, R. A., Diamond, M. S. and Colonna, M. (2006). Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 8459-64.
- Go, M., Kojima, T., Takano, K., Murata, M., Ichimiya, S., Tsubota, H., Himi, T. and Sawada, N. (2004). Expression and function of tight junctions in the crypt epithelium of human palatine tonsils. *J Histochem Cytochem* **52**, 1627-38.
- Goldstein, J. L., Ho, Y. K., Basu, S. K. and Brown, M. S. (1979). Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 333-7.
- Gonzalez-Mariscal, L., Islas, S., Contreras, R. G., Garcia-Villegas, M. R., Betanzos, A., Vega, J., Diaz-Quinonez, A., Martin-Orozco, N., Ortiz-Navarrete, V., Cereijido, M. et al. (1999). Molecular characterization of the tight junction protein ZO-1 in MDCK cells. *Exp Cell Res* **248**, 97-109.
- Gonzalez-Ramos, A., Cooper, K. D. and Hammerberg, C. (1996). Identification of a human dermal macrophage population responsible for constitutive restraint of primary dermal fibroblast proliferation. *J Invest Dermatol* **106**, 305-11.

- Gosselin, F., Magloire, H., Joffre, A. and Portier, M. M.** (1990). Cytokeratins as molecular markers in the evaluation of the precise differentiation stage of human gingival epithelium reconstituted in vitro. *Arch Oral Biol* **35 Suppl**, 217S-221S.
- Gough, P. J. and Gordon, S.** (2000). The role of scavenger receptors in the innate immune system. *Microbes Infect* **2**, 305-11.
- Gough, P. J., Greaves, D. R. and Gordon, S.** (1998). A naturally occurring isoform of the human macrophage scavenger receptor (SR-A) gene generated by alternative splicing blocks modified LDL uptake. *J Lipid Res* **39**, 531-43.
- Goval, J. J., Greimers, R., Boniver, J. and de Leval, L.** (2006). Germinal center dendritic cells express more ICAM-1 than extrafollicular dendritic cells and ICAM-1/LFA-1 interactions are involved in the capacity of dendritic cells to induce PBMCs proliferation. *J Histochem Cytochem* **54**, 75-84.
- Gramberg, T., Hofmann, H., Moller, P., Lator, P. F., Marzi, A., Geier, M., Krumbiegel, M., Winkler, T., Kirchhoff, F., Adams, D. H. et al.** (2005). LSECtin interacts with filovirus glycoproteins and the spike protein of SARS coronavirus. *Virology* **340**, 224-36.
- Granelli-Piperno, A., Delgado, E., Finkel, V., Paxton, W. and Steinman, R. M.** (1998). Immature dendritic cells selectively replicate macrophage-tropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiently transmit both M- and T-tropic virus to T cells. *J Virol* **72**, 2733-7.
- Granelli-Piperno, A., Pritsker, A., Pack, M., Shimeliovich, I., Arrighi, J. F., Park, C. G., Trumpfheller, C., Piguat, V., Moran, T. M. and Steinman, R. M.** (2005). Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin/CD209 is abundant on macrophages in the normal human lymph node and is not required for dendritic cell stimulation of the mixed leukocyte reaction. *J Immunol* **175**, 4265-73.
- Granelli-Piperno, A., Shimeliovich, I., Pack, M., Trumpfheller, C. and Steinman, R. M.** (2006). HIV-1 selectively infects a subset of nonmaturing BDCA1-positive dendritic cells in human blood. *J Immunol* **176**, 991-8.
- Granucci, F., Petralia, F., Urbano, M., Citterio, S., Di Tota, F., Santambrogio, L. and Ricciardi-Castagnoli, P.** (2003). The scavenger receptor MARCO mediates cytoskeleton rearrangements in dendritic cells and microglia. *Blood* **102**, 2940-7.
- Granucci, F., Vizzardelli, C., Virzi, E., Rescigno, M. and Ricciardi-Castagnoli, P.** (2001). Transcriptional reprogramming of dendritic cells by differentiation stimuli. *Eur J Immunol* **31**, 2539-46.
- Grassi, F., Hosmalin, A., McIlroy, D., Calvez, V., Debre, P. and Autran, B.** (1999). Depletion in blood CD11c-positive dendritic cells from HIV-infected patients. *Aids* **13**, 759-66.
- Gray, J. A., Dore, G. J., Li, Y., Supawitkul, S., Effler, P. and Kaldor, J. M.** (1997). HIV-1 infection among female commercial sex workers in rural Thailand. *Aids* **11**, 89-94.
- Gray, R. H., Kigozi, G., Serwadda, D., Makumbi, F., Watya, S., Nalugoda, F., Kiwanuka, N., Moulton, L. H., Chaudhary, M. A., Chen, M. Z. et al.** (2007). Male circumcision for HIV prevention in men in Rakai, Uganda: a randomised trial. *Lancet* **369**, 657-66.
- Greenberg, M. L. and Cammack, N.** (2004). Resistance to enfuvirtide, the first HIV fusion inhibitor. *J Antimicrob Chemother* **54**, 333-40.
- Greenhead, P., Hayes, P., Watts, P. S., Laing, K. G., Griffin, G. E. and Shattock, R. J.** (2000). Parameters of human immunodeficiency virus infection of human cervical tissue and inhibition by vaginal virucides. *J Virol* **74**, 5577-86.
- Gringhuis, S. I., den Dunnen, J., Litjens, M., van Het Hof, B., van Kooyk, Y. and Geijtenbeek, T. B.** (2007). C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. *Immunity* **26**, 605-16.
- Grolleau, A., Misek, D. E., Kuick, R., Hanash, S. and Mule, J. J.** (2003). Inducible expression of macrophage receptor Marco by dendritic cells following phagocytic uptake of dead cells uncovered by oligonucleotide arrays. *J Immunol* **171**, 2879-88.
- Groothuis, T. A. and Neefjes, J.** (2005). The many roads to cross-presentation. *J Exp Med* **202**, 1313-8.
- Grouard, G., Durand, I., Filgueira, L., Banchereau, J. and Liu, Y. J.** (1996). Dendritic cells capable of stimulating T cells in germinal centres. *Nature* **384**, 364-7.
- Grouard, G., Risoan, M. C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J. and Liu, Y. J.** (1997). The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* **185**, 1101-11.
- Guillemot, L., Hammar, E., Kaister, C., Ritz, J., Caille, D., Jond, L., Bauer, C., Meda, P. and Citi, S.** (2004). Disruption of the cingulin gene does not prevent tight junction formation but alters gene expression. *J Cell Sci* **117**, 5245-56.
- Gummuluru, S., KewalRamani, V. N. and Emerman, M.** (2002). Dendritic cell-mediated viral transfer to T cells is required for human immunodeficiency virus type 1 persistence in the face of rapid cell turnover. *J Virol* **76**, 10692-701.

Gummuluru, S., Rogel, M., Stamatatos, L. and Emerman, M. (2003). Binding of human immunodeficiency virus type 1 to immature dendritic cells can occur independently of DC-SIGN and mannose binding C-type lectin receptors via a cholesterol-dependent pathway. *J Virol* **77**, 12865-74.

Gupta, P., Collins, K. B., Ratner, D., Watkins, S., Naus, G. J., Landers, D. V. and Patterson, B. K. (2002). Memory CD4(+) T cells are the earliest detectable human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected cells in the female genital mucosal tissue during HIV-1 transmission in an organ culture system. *J Virol* **76**, 9868-76.

Gursel, M., Gursel, I., Mostowski, H. S. and Klinman, D. M. (2006). CXCL16 influences the nature and specificity of CpG-induced immune activation. *J Immunol* **177**, 1575-80.

-H-

Haase, A. T., Henry, K., Zupancic, M., Sedgewick, G., Faust, R. A., Melroe, H., Cavert, W., Gebhard, K., Staskus, K., Zhang, Z. Q. et al. (1996). Quantitative image analysis of HIV-1 infection in lymphoid tissue. *Science* **274**, 985-9.

Hadj-Rabia, S., Baala, L., Vabres, P., Hamel-Teillac, D., Jacquemin, E., Fabre, M., Lyonnet, S., De Prost, Y., Munnich, A., Hadchouel, M. et al. (2004). Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease. *Gastroenterology* **127**, 1386-90.

Haineault, C., Gourde, P., Perron, S., Desormeaux, A., Piret, J., Omar, R. F., Tremblay, R. R. and Bergeron, M. G. (2003). Thermoreversible gel formulation containing sodium lauryl sulfate as a potential contraceptive device. *Biol Reprod* **69**, 687-94.

Hansson, A., Bloor, B. K., Haig, Y., Morgan, P. R., Ekstrand, J. and Grafstrom, R. C. (2001). Expression of keratins in normal, immortalized and malignant oral epithelia in organotypic culture. *Oral Oncol* **37**, 419-30.

Harman, A. N., Wilkinson, J., Bye, C. R., Bosnjak, L., Stern, J. L., Nicholle, M., Lai, J. and Cunningham, A. L. (2006). HIV induces maturation of monocyte-derived dendritic cells and Langerhans cells. *J Immunol* **177**, 7103-13.

Harouse, J. M., Bhat, S., Spitalnik, S. L., Laughlin, M., Stefano, K., Silberberg, D. H. and Gonzalez-Scarano, F. (1991). Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide. *Science* **253**, 320-3.

Harouse, J. M., Collman, R. G. and Gonzalez-Scarano, F. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 infection of SK-N-MC cells: domains of gp120 involved in entry into a CD4-negative, galactosyl ceramide/3' sulfo-galactosyl ceramide-positive cell line. *J Virol* **69**, 7383-90.

Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M. and Weaver, C. T. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* **6**, 1123-32.

Harshyne, L. A., Zimmer, M. I., Watkins, S. C. and Barratt-Boyes, S. M. (2003). A role for class A scavenger receptor in dendritic cell nibbling from live cells. *J Immunol* **170**, 2302-9.

Hart, D. N. and McKenzie, J. L. (1990). Interstitial dendritic cells. *Int Rev Immunol* **6**, 127-38.

Hashimoto, K. (1971). Intercellular spaces of the human epidermis as demonstrated with lanthanum. *J Invest Dermatol* **57**, 17-31.

Haskins, J., Gu, L., Wittchen, E. S., Hibbard, J. and Stevenson, B. R. (1998). ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol* **141**, 199-208.

Hayakawa, Y., Screpanti, V., Yagita, H., Grandien, A., Ljunggren, H. G., Smyth, M. J. and Chambers, B. J. (2004). NK cell TRAIL eliminates immature dendritic cells in vivo and limits dendritic cell vaccination efficacy. *J Immunol* **172**, 123-9.

Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M. and Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**, 1099-103.

He, Y., Zhang, J., Donahue, C. and Falo, L. D., Jr. (2006). Skin-derived dendritic cells induce potent CD8(+) T cell immunity in recombinant lentivector-mediated genetic immunization. *Immunity* **24**, 643-56.

Headington, J. T. (1986). The dermal dendrocyte. *Adv Dermatol* **1**, 159-71.

Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H. and Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**, 1526-9.

Heise, C., Dandekar, S., Kumar, P., Duplantier, R., Donovan, R. M. and Halsted, C. H. (1991). Human immunodeficiency virus infection of enterocytes and mononuclear cells in human jejunal mucosa. *Gastroenterology* **100**, 1521-7.

- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K. and Akira, S.** (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* **3**, 196-200.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. et al.** (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740-5.
- Higgins, S. C., Jarnicki, A. G., Lavelle, E. C. and Mills, K. H.** (2006). TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to Bordetella pertussis: role of IL-17-producing T cells. *J Immunol* **177**, 7980-9.
- Hladik, F., Lentz, G., Delpit, E., McElroy, A. and McElrath, M. J.** (1999). Coexpression of CCR5 and IL-2 in human genital but not blood T cells: implications for the ontogeny of the CCR5+ Th1 phenotype. *J Immunol* **163**, 2306-13.
- Hladik, F., Sakchalathorn, P., Ballweber, L., Lentz, G., Fialkow, M., Eschenbach, D. and McElrath, M. J.** (2007). Initial Events in Establishing Vaginal Entry and Infection by Human Immunodeficiency Virus Type-1. *Immunity* **26**, 257-270.
- Hoene, V., Peiser, M. and Wanner, R.** (2006). Human monocyte-derived dendritic cells express TLR9 and react directly to the CpG-A oligonucleotide D19. *J Leukoc Biol* **80**, 1328-36.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K. K., Schlee, M. et al.** (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **314**, 994-7.
- Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S. and Hartmann, G.** (2002). Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* **168**, 4531-7.
- Horuk, R., Hesselgesser, J., Zhou, Y., Faulds, D., Halks-Miller, M., Harvey, S., Taub, D., Samson, M., Parmentier, M., Rucker, J. et al.** (1998). The CC chemokine I-309 inhibits CCR8-dependent infection by diverse HIV-1 strains. *J Biol Chem* **273**, 386-91.
- Hoshino, N., Katayama, N., Shibasaki, T., Ohishi, K., Nishioka, J., Masuya, M., Miyahara, Y., Hayashida, M., Shimomura, D., Kato, T. et al.** (2005). A novel role for Notch ligand Delta-1 as a regulator of human Langerhans cell development from blood monocytes. *J Leukoc Biol* **78**, 921-9.
- Hosmalin, A., McIlroy, D., Cheynier, R., Clauvel, J. P., Oksenhendler, E., Wain-Hobson, S., Debre, P. and Autran, B.** (1995). Splenic interdigitating dendritic cells in humans: characterization and HIV infection frequency in vivo. *Adv Exp Med Biol* **378**, 439-41.
- Hou, W. S. and Van Parijs, L.** (2004). A Bcl-2-dependent molecular timer regulates the lifespan and immunogenicity of dendritic cells. *Nat Immunol* **5**, 583-9.
- Hu, J., Gardner, M. B. and Miller, C. J.** (2000). Simian immunodeficiency virus rapidly penetrates the cervicovaginal mucosa after intravaginal inoculation and infects intraepithelial dendritic cells. *J Virol* **74**, 6087-95.
- Hubert, P., Jacobs, N., Caberg, J. H., Boniver, J. and Delvenne, P.** (2007). The cross-talk between dendritic and regulatory T cells: good or evil? *J Leukoc Biol*.
- Hugot, J. P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J. P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C. A., Gassull, M. et al.** (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**, 599-603.
- Hunger, R. E., Sieling, P. A., Ochoa, M. T., Sugaya, M., Burdick, A. E., Rea, T. H., Brennan, P. J., Belisle, J. T., Blauvelt, A., Porcelli, S. A. et al.** (2004). Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. *J Clin Invest* **113**, 701-8.

- I J -

- Ibata, B., Parr, E. L., King, N. J. and Parr, M. B.** (1997). Migration of foreign lymphocytes from the mouse vagina into the cervicovaginal mucosa and to the iliac lymph nodes. *Biol Reprod* **56**, 537-43.
- Ichiyama, K., Yokoyama-Kumakura, S., Tanaka, Y., Tanaka, R., Hirose, K., Bannai, K., Edamatsu, T., Yanaka, M., Niitani, Y., Miyano-Kurosaki, N. et al.** (2003). A duodenally absorbable CXC chemokine receptor 4 antagonist, KRH-1636, exhibits a potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4185-90.
- Ichiyasu, H., McCormack, J. M., McCarthy, K. M., Dombkowski, D., Preffer, F. I. and Schneeberger, E. E.** (2004). Matrix metalloproteinase-9-deficient dendritic cells have impaired migration through tracheal epithelial tight junctions. *Am J Respir Cell Mol Biol* **30**, 761-70.
- Iezzi, G., Frohlich, A., Ernst, B., Ampenberger, F., Saeland, S., Glaichenhaus, N. and Kopf, M.** (2006). Lymph node resident rather than skin-derived dendritic cells initiate specific T cell responses after Leishmania major infection. *J Immunol* **177**, 1250-6.

- Inaba, K., Inaba, M., Deguchi, M., Hagi, K., Yasumizu, R., Ikehara, S., Muramatsu, S. and Steinman, R. M.** (1993). Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major histocompatibility complex class II-negative progenitor in mouse bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3038-42.
- Ito, T., Wang, Y. H., Duramad, O., Hori, T., Delespesse, G. J., Watanabe, N., Qin, F. X., Yao, Z., Cao, W. and Liu, Y. J.** (2005). TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med* **202**, 1213-23.
- Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M. and Tsukita, S.** (1999a). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* **147**, 1351-63.
- Itoh, M., Morita, K. and Tsukita, S.** (1999b). Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin. *J Biol Chem* **274**, 5981-6.
- Itoh, M., Nagafuchi, A., Moroi, S. and Tsukita, S.** (1997). Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J Cell Biol* **138**, 181-92.
- Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Kitani-Yasuda, T. and Tsukita, S.** (1993). The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy. *J Cell Biol* **121**, 491-502.
- Iwasaki, A. and Medzhitov, R.** (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* **5**, 987-95.
- Izumi, K., Terashi, H., Marcelo, C. L. and Feinberg, S. E.** (2000). Development and characterization of a tissue-engineered human oral mucosa equivalent produced in a serum-free culture system. *J Dent Res* **79**, 798-805.
- Jaksits, S., Kriehuber, E., Charbonnier, A. S., Rappersberger, K., Stingl, G. and Maurer, D.** (1999). CD34+ cell-derived CD14+ precursor cells develop into Langerhans cells in a TGF-beta 1-dependent manner. *J Immunol* **163**, 4869-77.
- Jameson, B., Baribaud, F., Pohlmann, S., Ghavimi, D., Mortari, F., Doms, R. W. and Iwasaki, A.** (2002). Expression of DC-SIGN by dendritic cells of intestinal and genital mucosae in humans and rhesus macaques. *J Virol* **76**, 1866-75.
- Jarrossay, D., Napolitani, G., Colonna, M., Sallusto, F. and Lanzavecchia, A.** (2001). Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* **31**, 3388-93.
- Jeannin, P., Bottazzi, B., Sironi, M., Doni, A., Rusnati, M., Presta, M., Maina, V., Magistrelli, G., Haeuw, J. F., Hoeffel, G. et al.** (2005). Complexity and complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors. *Immunity* **22**, 551-60.
- Jesaitis, L. A. and Goodenough, D. A.** (1994). Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. *J Cell Biol* **124**, 949-61.

-K-

- Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R. W., Kastelein, R. A., Bazan, F. and Liu, Y. J.** (2001). Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* **194**, 863-9.
- Kaisho, T. and Akira, S.** (2006). Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* **117**, 979-87; quiz 988.
- Kang, D. C., Gopalkrishnan, R. V., Wu, Q., Jankowsky, E., Pyle, A. M. and Fisher, P. B.** (2002). mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 637-42.
- Kanmogne, G. D., Primeaux, C. and Grammas, P.** (2005). HIV-1 gp120 proteins alter tight junction protein expression and brain endothelial cell permeability: implications for the pathogenesis of HIV-associated dementia. *J Neuropathol Exp Neurol* **64**, 498-505.
- Kaplan, D. H., Jenison, M. C., Saeland, S., Shlomchik, W. D. and Shlomchik, M. J.** (2005). Epidermal langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity. *Immunity* **23**, 611-20.
- Kapsenberg, M. L.** (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* **3**, 984-93.
- Kariko, K., Ni, H., Capodici, J., Lamphier, M. and Weissman, D.** (2004). mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem* **279**, 12542-50.

- Kashihara, M., Ueda, M., Horiguchi, Y., Furukawa, F., Hanaoka, M. and Imamura, S. (1986). A monoclonal antibody specifically reactive to human Langerhans cells. *J Invest Dermatol* **87**, 602-7.
- Kassim, S. H., Rajasagi, N. K., Zhao, X., Chervenak, R. and Jennings, S. R. (2006). In vivo ablation of CD11c-positive dendritic cells increases susceptibility to herpes simplex virus type 1 infection and diminishes NK and T-cell responses. *J Virol* **80**, 3985-93.
- Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O. et al. (2005). Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* **23**, 19-28.
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K. J. et al. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* **441**, 101-5.
- Kato, M., Neil, T. K., Fearnley, D. B., McLellan, A. D., Vuckovic, S. and Hart, D. N. (2000). Expression of multilectin receptors and comparative FITC-dextran uptake by human dendritic cells. *Int Immunol* **12**, 1511-9.
- Katou, F., Ohtani, H., Saaristo, A., Nagura, H. and Motegi, K. (2000). Immunological activation of dermal Langerhans cells in contact with lymphocytes in a model of human inflamed skin. *Am J Pathol* **156**, 519-27.
- Katz, S. I., Tamaki, K. and Sachs, D. H. (1979). Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature* **282**, 324-6.
- Kawai, K., Shimura, H., Minagawa, M., Ito, A., Tomiyama, K. and Ito, M. (2002). Expression of functional Toll-like receptor 2 on human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci* **30**, 185-94.
- Kawai, T. and Akira, S. (2007). TLR signaling. *Semin Immunol* **19**, 24-32.
- Kawamura, T., Cohen, S. S., Borris, D. L., Aquilino, E. A., Glushakova, S., Margolis, L. B., Orenstein, J. M., Offord, R. E., Neurath, A. R. and Blauvelt, A. (2000). Candidate microbicides block HIV-1 infection of human immature Langerhans cells within epithelial tissue explants. *J Exp Med* **192**, 1491-500.
- Kawamura, T., Gulden, F. O., Sugaya, M., McNamara, D. T., Borris, D. L., Lederman, M. M., Orenstein, J. M., Zimmerman, P. A. and Blauvelt, A. (2003). R5 HIV productively infects Langerhans cells, and infection levels are regulated by compound CCR5 polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8401-6.
- Kerneis, S., Bogdanova, A., Kraehenbuhl, J. P. and Pringault, E. (1997). Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. *Science* **277**, 949-52.
- Kidd, P. (2003). Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* **8**, 223-46.
- Kiddugavu, M., Makumbi, F., Wawer, M. J., Serwadda, D., Sewankambo, N. K., Wabwire-Mangen, F., Lutalo, T., Meehan, M., Xianbin and Gray, R. H. (2003). Hormonal contraceptive use and HIV-1 infection in a population-based cohort in Rakai, Uganda. *Aids* **17**, 233-40.
- Kim, Y. J., Li, G. and Broxmeyer, H. E. (2002). 4-1BB ligand stimulation enhances myeloid dendritic cell maturation from human umbilical cord blood CD34+ progenitor cells. *J Hematother Stem Cell Res* **11**, 895-903.
- Kissenpfennig, A., Ait-Yahia, S., Clair-Moninot, V., Stossel, H., Badell, E., Bordat, Y., Pooley, J. L., Lang, T., Prina, E., Coste, I. et al. (2005a). Disruption of the langerin/CD207 gene abolishes Birbeck granules without a marked loss of Langerhans cell function. *Mol Cell Biol* **25**, 88-99.
- Kissenpfennig, A., Henri, S., Dubois, B., Laplace-Builhe, C., Perrin, P., Romani, N., Tripp, C. H., Douillard, P., Leserman, L., Kaiserlian, D. et al. (2005b). Dynamics and function of Langerhans cells in vivo dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity* **22**, 643-54.
- Kobayashi, K. S., Chamaillard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Nunez, G. and Flavell, R. A. (2005). Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* **307**, 731-4.
- Kock, A., Schwarz, T., Kirnbauer, R., Urbanski, A., Perry, P., Ansel, J. C. and Luger, T. A. (1990). Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *J Exp Med* **172**, 1609-14.
- Kodama, T., Freeman, M., Rohrer, L., Zabrecky, J., Matsudaira, P. and Krieger, M. (1990). Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature* **343**, 531-5.
- Kostrewa, D., Brockhaus, M., D'Arcy, A., Dale, G. E., Nelboeck, P., Schmid, G., Mueller, F., Bazzoni, G., Dejana, E., Bartfai, T. et al. (2001). X-ray structure of junctional adhesion molecule: structural basis for homophilic adhesion via a novel dimerization motif. *Embo J* **20**, 4391-8.
- Krieger, M. (1997). The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. *Curr Opin Lipidol* **8**, 275-80.
- Kuritzkes, D. R., Jacobson, J., Powderly, W. G., Godofsky, E., DeJesus, E., Haas, F., Reimann, K. A., Larson, J. L., Yarbough, P. O., Curt, V. et al. (2004). Antiretroviral activity of the anti-CD4 monoclonal antibody TNX-355 in patients infected with HIV type 1. *J Infect Dis* **189**, 286-91.

Kurotaki, T., Tamura, Y., Ueda, G., Oura, J., Kutomi, G., Hirohashi, Y., Sahara, H., Torigoe, T., Hiratsuka, H., Sunakawa, H. et al. (2007). Efficient Cross-Presentation by Heat Shock Protein 90-Peptide Complex-Loaded Dendritic Cells via an Endosomal Pathway. *J Immunol* **179**, 1803-13.

Kwon, D. S., Gregorio, G., Bitton, N., Hendrickson, W. A. and Littman, D. R. (2002). DC-SIGN-Mediated Internalization of HIV Is Required for Trans-Enhancement of T Cell Infection. *Immunity* **16**, 135-44.

-L-

Laga, M., Manoka, A., Kivuvu, M., Malele, B., Tuliza, M., Nzila, N., Goeman, J., Behets, F., Batter, V., Alary, M. et al. (1993). Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. *Aids* **7**, 95-102.

Lagaye, S., Derrien, M., Menu, E., Coito, C., Tresoldi, E., Mauclere, P., Scarlatti, G., Chaouat, G., Barre-Sinoussi, F. and Bomsel, M. (2001). Cell-to-cell contact results in a selective translocation of maternal human immunodeficiency virus type 1 quasispecies across a trophoblastic barrier by both transcytosis and infection. *J Virol* **75**, 4780-91.

Lalezari, J. P., Henry, K., O'Hearn, M., Montaner, J. S., Piliero, P. J., Trottier, B., Walmsley, S., Cohen, C., Kuritzkes, D. R., Eron, J. J., Jr. et al. (2003). Enfuvirtide, an HIV-1 fusion inhibitor, for drug-resistant HIV infection in North and South America. *N Engl J Med* **348**, 2175-85.

Langbein, L., Grund, C., Kuhn, C., Praetzel, S., Kartenbeck, J., Brandner, J. M., Moll, I. and Franke, W. W. (2002). Tight junctions and compositionally related junctional structures in mammalian stratified epithelia and cell cultures derived therefrom. *Eur J Cell Biol* **81**, 419-35.

Langerhans, P. (1868). Über die nerven der menschlichen haut. *Virchows Arch Path Anat* **44**, 325-337.

Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W. M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J. D., McClanahan, T., Kastelein, R. A. and Cua, D. J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* **201**, 233-40.

Larregina, A. T., Morelli, A. E., Kolkowski, E., Sanjuan, N., Barboza, M. E. and Fainboim, L. (1997). Pattern of cytokine receptors expressed by human dendritic cells migrated from dermal explants. *Immunology* **91**, 303-13.

Larregina, A. T., Morelli, A. E., Spencer, L. A., Logar, A. J., Watkins, S. C., Thomson, A. W. and Falo, L. D., Jr. (2001). Dermal-resident CD14⁺ cells differentiate into Langerhans cells. *Nat Immunol* **2**, 1151-8.

Larsson, M., Fonteneau, J. F., Somersan, S., Sanders, C., Bickham, K., Thomas, E. K., Mahnke, K. and Bhardwaj, N. (2001). Efficiency of cross presentation of vaccinia virus-derived antigens by human dendritic cells. *Eur J Immunol* **31**, 3432-42.

Le Borgne, M., Etchart, N., Goubier, A., Lira, S. A., Sirard, J. C., van Rooijen, N., Caux, C., Ait-Yahia, S., Vicari, A., Kaiserlian, D. et al. (2006). Dendritic cells rapidly recruited into epithelial tissues via CCR6/CCL20 are responsible for CD8⁺ T cell crosspriming in vivo. *Immunity* **24**, 191-201.

Le Varlet, B., Dezutter-Dambuyant, C., Staquet, M. J., Delorme, P. and Schmitt, D. (1991). Human epidermal Langerhans cells express integrins of the beta 1 subfamily. *J Invest Dermatol* **96**, 518-22.

Lebre, M. C., van der Aar, A. M., van Baarsen, L., van Capel, T. M., Schuitemaker, J. H., Kapsenberg, M. L. and de Jong, E. C. (2007). Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J Invest Dermatol* **127**, 331-41.

Lederman, M. M., Offord, R. E. and Hartley, O. (2006). Microbicides and other topical strategies to prevent vaginal transmission of HIV. *Nat Rev Immunol* **6**, 371-82.

Lederman, M. M., Veazey, R. S., Offord, R., Mosier, D. E., Dufour, J., Mefford, M., Piatak, M., Jr., Lifson, J. D., Salkowitz, J. R., Rodriguez, B. et al. (2004). Prevention of vaginal SHIV transmission in rhesus macaques through inhibition of CCR5. *Science* **306**, 485-7.

Lee, B., Leslie, G., Soilleux, E., O'Doherty, U., Baik, S., Levroney, E., Flummerfelt, K., Swiggard, W., Coleman, N., Malim, M. et al. (2001). cis Expression of DC-SIGN allows for more efficient entry of human and simian immunodeficiency viruses via CD4 and a coreceptor. *J Virol* **75**, 12028-38.

Lee, M. S. and Kim, Y. J. (2007). Pattern-recognition receptor signaling initiated from extracellular, membrane, and cytoplasmic space. *Mol Cells* **23**, 1-10.

Leibundgut-Landmann, S., Gross, O., Robinson, M. J., Osorio, F., Slack, E. C., Tsoni, S. V., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Brown, G. D., Ruland, J. et al. (2007). Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol* **8**, 630-638.

Lenz, A., Heine, M., Schuler, G. and Romani, N. (1993). Human and murine dermis contain dendritic cells. Isolation by means of a novel method and phenotypical and functional characterization. *J Clin Invest* **92**, 2587-96.

Liao, F., Alkhatib, G., Peden, K. W., Sharma, G., Berger, E. A. and Farber, J. M. (1997). STRL33, A novel chemokine receptor-like protein, functions as a fusion cofactor for both macrophage-tropic and T cell line-tropic HIV-1. *J Exp Med* **185**, 2015-23.

Liu, R., Paxton, W. A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S. R., Horuk, R., MacDonald, M. E., Stuhlmann, H., Koup, R. A. and Landau, N. R. (1996). Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* **86**, 367-77.

Liu, W., Tang, L., Zhang, G., Wei, H., Cui, Y., Guo, L., Gou, Z., Chen, X., Jiang, D., Zhu, Y. et al. (2004). Characterization of a novel C-type lectin-like gene, LSEctin: demonstration of carbohydrate binding and expression in sinusoidal endothelial cells of liver and lymph node. *J Biol Chem* **279**, 18748-58.

Liu, Y. J. (2005). IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* **23**, 275-306.

Lore, K., Sonnerborg, A., Brostrom, C., Goh, L. E., Perrin, L., McDade, H., Stellbrink, H. J., Gazzard, B., Weber, R., Napolitano, L. A. et al. (2002). Accumulation of DC-SIGN+CD40+ dendritic cells with reduced CD80 and CD86 expression in lymphoid tissue during acute HIV-1 infection. *Aids* **16**, 683-92.

Lucas, M., Schachterle, W., Oberle, K., Aichele, P. and Diefenbach, A. (2007). Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* **26**, 503-17.

Ludwig, R. J., Zollner, T. M., Santoso, S., Hardt, K., Gille, J., Baatz, H., Johann, P. S., Pfeffer, J., Radeke, H. H., Schon, M. P. et al. (2005). Junctional adhesion molecules (JAM)-B and -C contribute to leukocyte extravasation to the skin and mediate cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol* **125**, 969-76.

Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R. and Iwasaki, A. (2003). Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* **198**, 513-20.

-M-

Maaser, C., Heidemann, J., von Eiff, C., Lugering, A., Spahn, T. W., Binion, D. G., Domschke, W., Lugering, N. and Kucharzik, T. (2004). Human intestinal microvascular endothelial cells express Toll-like receptor 5: a binding partner for bacterial flagellin. *J Immunol* **172**, 5056-62.

Macatonia, S. E., Gompels, M., Pinching, A. J., Patterson, S. and Knight, S. C. (1992). Antigen-presentation by macrophages but not by dendritic cells in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Immunology* **75**, 576-81.

Macatonia, S. E., Lau, R., Patterson, S., Pinching, A. J. and Knight, S. C. (1990). Dendritic cell infection, depletion and dysfunction in HIV-infected individuals. *Immunology* **71**, 38-45.

MacDonald, K. P., Munster, D. J., Clark, G. J., Dzionek, A., Schmitz, J. and Hart, D. N. (2002). Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* **100**, 4512-20.

Maeda, S., Hsu, L. C., Liu, H., Bankston, L. A., Iimura, M., Kagnoff, M. F., Eckmann, L. and Karin, M. (2005). Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science* **307**, 734-8.

Malcolm, R. K., Woolfson, A. D., Toner, C. F., Morrow, R. J. and McCullagh, S. D. (2005). Long-term, controlled release of the HIV microbicide TMC120 from silicone elastomer vaginal rings. *J Antimicrob Chemother* **56**, 954-6.

Mandell, K. J. and Parkos, C. A. (2005). The JAM family of proteins. *Adv Drug Deliv Rev* **57**, 857-67.

Mangan, P. R., Harrington, L. E., O'Quinn, D. B., Helms, W. S., Bullard, D. C., Elson, C. O., Hatton, R. D., Wahl, S. M., Schoeb, T. R. and Weaver, C. T. (2006). Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* **441**, 231-4.

Manz, M. G., Traver, D., Akashi, K., Merad, M., Miyamoto, T., Engleman, E. G. and Weissman, I. L. (2001). Dendritic cell development from common myeloid progenitors. *Ann N Y Acad Sci* **938**, 167-73; discussion 173-4.

Maranon, C., Desoutter, J. F., Hoeffel, G., Cohen, W., Hanau, D. and Hosmalin, A. (2004). Dendritic cells cross-present HIV antigens from live as well as apoptotic infected CD4+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6092-7.

Margolis, L. and Shattock, R. (2006). Selective transmission of CCR5-utilizing HIV-1: the 'gatekeeper' problem resolved? *Nat Rev Microbiol* **4**, 312-7.

- Markowicz, S. and Engleman, E. G.** (1990). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes differentiation and survival of human peripheral blood dendritic cells in vitro. *J Clin Invest* **85**, 955-61.
- Marshall-Clarke, S., Downes, J. E., Haga, I. R., Bowie, A. G., Borrow, P., Pennock, J. E., Grecis, R. K. and Rothwell, P.** (2007). Polyinosinic acid is a ligand for toll-like receptor 3. *J Biol Chem*.
- Martensson, U. E., Fenyó, E. M., Olde, B. and Owman, C.** (2006). Characterization of the human chemerin receptor--ChemR23/CMKLR1--as co-receptor for human and simian immunodeficiency virus infection, and identification of virus-binding receptor domains. *Virology* **355**, 6-17.
- Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A. et al.** (1998). Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* **142**, 117-27.
- Martin, H. L., Jr., Nyange, P. M., Richardson, B. A., Lavreys, L., Mandaliya, K., Jackson, D. J., Ndinya-Achola, J. O. and Kreiss, J.** (1998). Hormonal contraception, sexually transmitted diseases, and risk of heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* **178**, 1053-9.
- Martin, H. L., Richardson, B. A., Nyange, P. M., Lavreys, L., Hillier, S. L., Chohan, B., Mandaliya, K., Ndinya-Achola, J. O., Bwayo, J. and Kreiss, J.** (1999). Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. *J Infect Dis* **180**, 1863-8.
- Marx, P. A., Spira, A. I., Gettie, A., Dailey, P. J., Veazey, R. S., Lackner, A. A., Mahoney, C. J., Miller, C. J., Claypool, L. E., Ho, D. D. et al.** (1996). Progesterone implants enhance SIV vaginal transmission and early virus load. *Nat Med* **2**, 1084-9.
- Matloubian, M., David, A., Engel, S., Ryan, J. E. and Cyster, J. G.** (2000). A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nat Immunol* **1**, 298-304.
- Matsuo, M., Nagata, Y., Sato, E., Atanackovic, D., Valmori, D., Chen, Y. T., Ritter, G., Mellman, I., Old, L. J. and Gnjatic, S.** (2004). IFN-gamma enables cross-presentation of exogenous protein antigen in human Langerhans cells by potentiating maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 14467-72.
- Mattagajasingh, S. N., Huang, S. C., Hartenstein, J. S. and Benz, E. J., Jr.** (2000). Characterization of the interaction between protein 4.1R and ZO-2. A possible link between the tight junction and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* **275**, 30573-85.
- Matter, K. and Balda, M. S.** (2003). Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 225-36.
- Matzinger, P.** (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science* **296**, 301-5.
- McClure, C. P., Tighe, P. J., Robins, R. A., Bansal, D., Bowman, C. A., Kingston, M. and Ball, J. K.** (2005). HIV coreceptor and chemokine ligand gene expression in the male urethra and female cervix. *Aids* **19**, 1257-65.
- McCoombe, S. G. and Short, R. V.** (2006). Potential HIV-1 target cells in the human penis. *Aids* **20**, 1491-5.
- McDonald, D., Wu, L., Bohks, S. M., KewalRamani, V. N., Unutmaz, D. and Hope, T. J.** (2003). Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science* **300**, 1295-7.
- McGowan, I.** (2006). Microbicides: a new frontier in HIV prevention. *Biologicals* **34**, 241-55.
- McIlroy, D., Autran, B., Cheynier, R., Wain-Hobson, S., Clauvel, J. P., Oksenhendler, E., Debre, P. and Hosmalin, A.** (1995). Infection frequency of dendritic cells and CD4+ T lymphocytes in spleens of human immunodeficiency virus-positive patients. *J Virol* **69**, 4737-45.
- McIlroy, D., Troadec, C., Grassi, F., Samri, A., Barrou, B., Autran, B., Debre, P., Feuillard, J. and Hosmalin, A.** (2001). Investigation of human spleen dendritic cell phenotype and distribution reveals evidence of in vivo activation in a subset of organ donors. *Blood* **97**, 3470-7.
- McLellan, A. D., Heiser, A., Sorg, R. V., Fearnley, D. B. and Hart, D. N.** (1998). Dermal dendritic cells associated with T lymphocytes in normal human skin display an activated phenotype. *J Invest Dermatol* **111**, 841-9.
- Means, T. K., Hayashi, F., Smith, K. D., Aderem, A. and Luster, A. D.** (2003). The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells. *J Immunol* **170**, 5165-75.
- Medzhitov, R. and Janeway, C. A., Jr.** (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* **91**, 295-8.
- Medzhitov, R. and Janeway, C. A., Jr.** (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* **296**, 298-300.
- Mellman, I.** (2005). Antigen processing and presentation by dendritic cells: cell biological mechanisms. *Adv Exp Med Biol* **560**, 63-7.
- Meng, G., Wei, X., Wu, X., Sellers, M. T., Decker, J. M., Moldoveanu, Z., Orenstein, J. M., Graham, M. F., Kappes, J. C., Mestecky, J. et al.** (2002). Primary intestinal epithelial cells selectively transfer R5 HIV-1 to CCR5+ cells. *Nat Med* **8**, 150-6.

- Merad, M., Manz, M. G., Karsunky, H., Wagers, A., Peters, W., Charo, I., Weissman, I. L., Cyster, J. G. and Engleman, E. G. (2002). Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol* **3**, 1135-41.
- Merlo, A., Calcaterra, C., Menard, S. and Balsari, A. (2007). Cross-talk between Toll-like receptors 5 and 9 on activation of human immune responses. *J Leukoc Biol*.
- Mermin, J. H., Holodniy, M., Katzenstein, D. A. and Merigan, T. C. (1991). Detection of human immunodeficiency virus DNA and RNA in semen by the polymerase chain reaction. *J Infect Dis* **164**, 769-72.
- Meunier, L., Gonzalez-Ramos, A. and Cooper, K. D. (1993). Heterogeneous populations of class II MHC+ cells in human dermal cell suspensions. Identification of a small subset responsible for potent dermal antigen-presenting cell activity with features analogous to Langerhans cells. *J Immunol* **151**, 4067-80.
- Meyer-Wentrup, F., Figdor, C. G., Ansems, M., Brossart, P., Wright, M. D., Adema, G. J. and van Spriell, A. B. (2007). Dectin-1 interaction with tetraspanin CD37 inhibits IL-6 production. *J Immunol* **178**, 154-62.
- Meylan, E. and Tschopp, J. (2006). Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses. *Mol Cell* **22**, 561-9.
- Meylan, E., Tschopp, J. and Karin, M. (2006). Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* **442**, 39-44.
- Michael, N. L., Nelson, J. A., KewalRamani, V. N., Chang, G., O'Brien, S. J., Mascola, J. R., Volsky, B., Louder, M., White, G. C., 2nd, Littman, D. R. et al. (1998). Exclusive and persistent use of the entry coreceptor CXCR4 by human immunodeficiency virus type 1 from a subject homozygous for CCR5 delta32. *J Virol* **72**, 6040-7.
- Misslitz, A. C., Bonhagen, K., Harbecke, D., Lippuner, C., Kamradt, T. and Aebischer, T. (2004). Two waves of antigen-containing dendritic cells in vivo in experimental Leishmania major infection. *Eur J Immunol* **34**, 715-25.
- Mohamadzadeh, M., Berard, F., Essert, G., Chalouni, C., Pulendran, B., Davoust, J., Bridges, G., Palucka, A. K. and Banchereau, J. (2001). Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells. *J Exp Med* **194**, 1013-20.
- Mondor, I., Ugolini, S. and Sattentau, Q. J. (1998). Human immunodeficiency virus type 1 attachment to HeLa CD4 cells is CD4 independent and gp120 dependent and requires cell surface heparans. *J Virol* **72**, 3623-34.
- Moore, J. P. and Stevenson, M. (2000). New targets for inhibitors of HIV-1 replication. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 40-9.
- Morelli, A. E., Rubin, J. P., Erdos, G., Tkacheva, O. A., Mathers, A. R., Zahorchak, A. F., Thomson, A. W., Faló, L. D., Jr. and Larregina, A. T. (2005). CD4+ T cell responses elicited by different subsets of human skin migratory dendritic cells. *J Immunol* **175**, 7905-15.
- Morelli, A. E. and Thomson, A. W. (2007). Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol* **7**, 610-621.
- Moretta, L., Ferlazzo, G., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Mingari, M. C. and Moretta, A. (2006). Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions. *Immunol Rev* **214**, 219-28.
- Morita, K., Furuse, M., Fujimoto, K. and Tsukita, S. (1999). Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 511-6.
- Morita, K., Tsukita, S. and Miyachi, Y. (2004). Tight junction-associated proteins (occludin, ZO-1, claudin-1, claudin-4) in squamous cell carcinoma and Bowen's disease. *Br J Dermatol* **151**, 328-34.
- Moses, S., Bradley, J. E., Nagelkerke, N. J., Ronald, A. R., Ndinya-Achola, J. O. and Plummer, F. A. (1990). Geographical patterns of male circumcision practices in Africa: association with HIV seroprevalence. *Int J Epidemiol* **19**, 693-7.
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. and Coffman, R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* **136**, 2348-57.
- Muller, S. L., Portwich, M., Schmidt, A., Utepbergenov, D. I., Huber, O., Blasig, I. E. and Krause, G. (2005). The tight junction protein occludin and the adherens junction protein alpha-catenin share a common interaction mechanism with ZO-1. *J Biol Chem* **280**, 3747-56.
- Murakami, T., Nakajima, T., Koyanagi, Y., Tachibana, K., Fujii, N., Tamamura, H., Yoshida, N., Waki, M., Matsumoto, A., Yoshie, O. et al. (1997). A small molecule CXCR4 inhibitor that blocks T cell line-tropic HIV-1 infection. *J Exp Med* **186**, 1389-93.
- Murao, K., Terpstra, V., Green, S. R., Kondratenko, N., Steinberg, D. and Quehenberger, O. (1997). Characterization of CLA-1, a human homologue of rodent scavenger receptor BI, as a receptor for high density lipoprotein and apoptotic thymocytes. *J Biol Chem* **272**, 17551-7.
- Murphy, T. V., Kotecha, N. and Hill, M. A. (2007). Endothelium-independent constriction of isolated, pressurized arterioles by N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME). *Br J Pharmacol* **151**, 602-9.

Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'Amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., van't Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, L. P., Allavena, P. et al. (2000). Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* **164**, 5998-6004.

-N-

Nakao, Y., Funami, K., Kikkawa, S., Taniguchi, M., Nishiguchi, M., Fukumori, Y., Seya, T. and Matsumoto, M. (2005). Surface-expressed TLR6 participates in the recognition of diacylated lipopeptide and peptidoglycan in human cells. *J Immunol* **174**, 1566-73.

Napolitani, G., Rinaldi, A., Berton, F., Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (2005). Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol* **6**, 769-76.

Nelson, K. E., Eiumtrakul, S., Celentano, D., Maclean, I., Ronald, A., Suprasert, S., Hoover, D. R., Kuntolbutra, S. and Zenilman, J. M. (1997). The association of herpes simplex virus type 2 (HSV-2), Haemophilus ducreyi, and syphilis with HIV infection in young men in northern Thailand. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **16**, 293-300.

Nestle, F. O., Conrad, C., Tun-Kyi, A., Homey, B., Gombert, M., Boyman, O., Burg, G., Liu, Y. J. and Gilliet, M. (2005). Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J Exp Med* **202**, 135-43.

Nestle, F. O., Filgueira, L., Nickoloff, B. J. and Burg, G. (1998). Human dermal dendritic cells process and present soluble protein antigens. *J Invest Dermatol* **110**, 762-6.

Nestle, F. O., Zheng, X. G., Thompson, C. B., Turka, L. A. and Nickoloff, B. J. (1993). Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *J Immunol* **151**, 6535-45.

Nicoletti, A., Caligiuri, G., Tornberg, I., Kodama, T., Stemme, S. and Hansson, G. K. (1999). The macrophage scavenger receptor type A directs modified proteins to antigen presentation. *Eur J Immunol* **29**, 512-21.

Nobile, C., Petit, C., Moris, A., Skrabal, K., Abastado, J. P., Mammano, F. and Schwartz, O. (2005). Covert human immunodeficiency virus replication in dendritic cells and in DC-SIGN-expressing cells promotes long-term transmission to lymphocytes. *J Virol* **79**, 5386-99.

Nolte, M. A., Leibundgut-Landmann, S., Joffre, O. and Reis e Sousa, C. (2007). Dendritic cell quiescence during systemic inflammation driven by LPS stimulation of radioresistant cells in vivo. *J Exp Med* **204**, 1487-501.

Norvell, M. K., Benrubi, G. I. and Thompson, R. J. (1984). Investigation of microtrauma after sexual intercourse. *J Reprod Med* **29**, 269-71.

Nouri-Shirazi, M., Banchereau, J., Bell, D., Burkeholder, S., Kraus, E. T., Davoust, J. and Palucka, K. A. (2000). Dendritic cells capture killed tumor cells and present their antigens to elicit tumor-specific immune responses. *J Immunol* **165**, 3797-803.

Novak, N., Valenta, R., Bohle, B., Laffer, S., Haberstick, J., Kraft, S. and Bieber, T. (2004). FcεRI engagement of Langerhans cell-like dendritic cells and inflammatory dendritic epidermal cell-like dendritic cells induces chemotactic signals and different T-cell phenotypes in vitro. *J Allergy Clin Immunol* **113**, 949-57.

-O P Q-

O'Doherty, U., Peng, M., Gezelter, S., Swiggard, W. J., Betjes, M., Bhardwaj, N. and Steinman, R. M. (1994). Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* **82**, 487-93.

Oberlin, E., Amara, A., Bachelier, F., Bessia, C., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F., Schwartz, O., Heard, J. M., Clark-Lewis, I., Legler, D. F. et al. (1996). The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* **382**, 833-5.

Oka, K., Sawamura, T., Kikuta, K., Itokawa, S., Kume, N., Kita, T. and Masaki, T. (1998). Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates phagocytosis of aged/apoptotic cells in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9535-40.

- Olaitan, A., Johnson, M. A., MacLean, A. and Poulter, L. W.** (1996). The distribution of immunocompetent cells in the genital tract of HIV-positive women. *Aids* **10**, 759-64.
- Opitz, B., Puschel, A., Beermann, W., Hocke, A. C., Forster, S., Schmeck, B., van Laak, V., Chakraborty, T., Suttorp, N. and Hippenstiel, S.** (2006). *Listeria monocytogenes* activated p38 MAPK and induced IL-8 secretion in a nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent manner in endothelial cells. *J Immunol* **176**, 484-90.
- Ouzilou, L., Caliot, E., Pelletier, I., Prevost, M. C., Pringault, E. and Colbere-Garapin, F.** (2002). Poliovirus transcytosis through M-like cells. *J Gen Virol* **83**, 2177-82.
- Pacanowski, J., Kahi, S., Baillet, M., Lebon, P., Deveau, C., Goujard, C., Meyer, L., Oksenhendler, E., Sinet, M. and Hosmalin, A.** (2001). Reduced blood CD123+ (lymphoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cell numbers in primary HIV-1 infection. *Blood* **98**, 3016-21.
- Palucka, K. A., Taquet, N., Sanchez-Chapuis, F. and Gluckman, J. C.** (1998). Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J Immunol* **160**, 4587-95.
- Paquette, R. L., Hsu, N. C., Kiertscher, S. M., Park, A. N., Tran, L., Roth, M. D. and Glaspy, J. A.** (1998). Interferon-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor differentiate peripheral blood monocytes into potent antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol* **64**, 358-67.
- Park, H., Li, Z., Yang, X. O., Chang, S. H., Nurieva, R., Wang, Y. H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q. et al.** (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* **6**, 1133-41.
- Patel, M., Yanagishita, M., Roderiquez, G., Bou-Habib, D. C., Oravec, T., Hascall, V. C. and Norcross, M. A.** (1993). Cell-surface heparan sulfate proteoglycan mediates HIV-1 infection of T-cell lines. *AIDS Res Hum Retroviruses* **9**, 167-74.
- Patterson, B. K., Landay, A., Siegel, J. N., Flener, Z., Pessis, D., Chaviano, A. and Bailey, R. C.** (2002). Susceptibility to human immunodeficiency virus-1 infection of human foreskin and cervical tissue grown in explant culture. *Am J Pathol* **161**, 867-73.
- Patterson, S., Donaghy, H., Amjadi, P., Gazzard, B., Gotch, F. and Kelleher, P.** (2005). Human BDCA-1-positive blood dendritic cells differentiate into phenotypically distinct immature and mature populations in the absence of exogenous maturational stimuli: differentiation failure in HIV infection. *J Immunol* **174**, 8200-9.
- Patterson, S. and Knight, S. C.** (1987). Susceptibility of human peripheral blood dendritic cells to infection by human immunodeficiency virus. *J Gen Virol* **68 (Pt 4)**, 1177-81.
- Patterson, S., Rae, A., Hockey, N., Gilmour, J. and Gotch, F.** (2001). Plasmacytoid dendritic cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus type 1 infection and release infectious virus. *J Virol* **75**, 6710-3.
- Patton, D. L., Sweeney, Y. T., Balkus, J. E. and Hillier, S. L.** (2006). Vaginal and rectal topical microbicide development: safety and efficacy of 1.0% Savvy (C31G) in the pigtailed macaque. *Sex Transm Dis* **33**, 691-5.
- Patton, D. L., Thwin, S. S., Meier, A., Hooton, T. M., Stapleton, A. E. and Eschenbach, D. A.** (2000). Epithelial cell layer thickness and immune cell populations in the normal human vagina at different stages of the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* **183**, 967-73.
- Peiser, L., De Winther, M. P., Makepeace, K., Hollinshead, M., Coull, P., Plested, J., Kodama, T., Moxon, E. R. and Gordon, S.** (2002). The class A macrophage scavenger receptor is a major pattern recognition receptor for *Neisseria meningitidis* which is independent of lipopolysaccharide and not required for secretory responses. *Infect Immun* **70**, 5346-54.
- Pelletier, M., Perreault, C., Landry, D., David, M. and Montplaisir, S.** (1984). Ontogeny of human epidermal Langerhans cells. *Transplantation* **38**, 544-6.
- Pena-Cruz, V., Ito, S., Dascher, C. C., Brenner, M. B. and Sugita, M.** (2003). Epidermal Langerhans cells efficiently mediate CD1a-dependent presentation of microbial lipid antigens to T cells. *J Invest Dermatol* **121**, 517-21.
- Perotti, M. E., Pirovano, A. and Phillips, D. M.** (2003). Carrageenan formulation prevents macrophage trafficking from vagina: implications for microbicide development. *Biol Reprod* **69**, 933-9.
- Persidsky, Y., Heilman, D., Haorah, J., Zeligyanskaya, M., Persidsky, R., Weber, G. A., Shimokawa, H., Kaibuchi, K. and Ikezu, T.** (2006). Rho-mediated regulation of tight junctions during monocyte migration across the blood-brain barrier in HIV-1 encephalitis (HIVE). *Blood* **107**, 4770-80.
- Piccioli, D., Tavarini, S., Borgogni, E., Steri, V., Nuti, S., Sammiceli, C., Bardelli, M., Montagna, D., Locatelli, F. and Wack, A.** (2007). Functional specialization of human circulating CD16 and CD1c myeloid dendritic-cell subsets. *Blood* **109**, 5371-9.
- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C. P., Naslund, T. I., Liljestrom, P., Weber, F. and Reis e Sousa, C.** (2006). RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* **314**, 997-1001.

- Piemonti, L., Bernasconi, S., Luini, W., Trobonjaca, Z., Minty, A., Allavena, P. and Mantovani, A.** (1995). IL-13 supports differentiation of dendritic cells from circulating precursors in concert with GM-CSF. *Eur Cytokine Netw* **6**, 245-52.
- Pierre, P. and Mellman, I.** (1998). Exploring the mechanisms of antigen processing by cell fractionation. *Curr Opin Immunol* **10**, 145-53.
- Pikkarainen, T., Brannstrom, A. and Tryggvason, K.** (1999). Expression of macrophage MARCO receptor induces formation of dendritic plasma membrane processes. *J Biol Chem* **274**, 10975-82.
- Pion, M., Granelli-Piperno, A., Mangeat, B., Stalder, R., Correa, R., Steinman, R. M. and Piguet, V.** (2006). APOBEC3G/3F mediates intrinsic resistance of monocyte-derived dendritic cells to HIV-1 infection. *J Exp Med* **203**, 2887-93.
- Platt, N. and Gordon, S.** (2001). Is the class A macrophage scavenger receptor (SR-A) multifunctional? - The mouse's tale. *J Clin Invest* **108**, 649-54.
- Pohlmann, S., Stolte, N., Munch, J., Ten Haaf, P., Heeney, J. L., Stahl-Hennig, C. and Kirchhoff, F.** (1999). Co-receptor usage of BOB/GPR15 in addition to CCR5 has no significant effect on replication of simian immunodeficiency virus in vivo. *J Infect Dis* **180**, 1494-502.
- Pohlmann, S., Zhang, J., Baribaud, F., Chen, Z., Leslie, G. J., Lin, G., Granelli-Piperno, A., Doms, R. W., Rice, C. M. and McKeating, J. A.** (2003). Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol* **77**, 4070-80.
- Pollard, V. W. and Malim, M. H.** (1998). The HIV-1 Rev protein. *Annu Rev Microbiol* **52**, 491-532.
- Pool, R., Hart, G., Green, G., Harrison, S., Nyanzi, S. and Whitworth, J.** (2000). Men's attitudes to condoms and female controlled means of protection against HIV and STDs in south-western Uganda. *Cult Health Sex* **2**, 197-211.
- Pope, M., Betjes, M. G., Romani, N., Hirmand, H., Cameron, P. U., Hoffman, L., Gezelter, S., Schuler, G. and Steinman, R. M.** (1994). Conjugates of dendritic cells and memory T lymphocytes from skin facilitate productive infection with HIV-1. *Cell* **78**, 389-98.
- Pope, M., Gezelter, S., Gallo, N., Hoffman, L. and Steinman, R. M.** (1995). Low levels of HIV-1 infection in cutaneous dendritic cells promote extensive viral replication upon binding to memory CD4+ T cells. *J Exp Med* **182**, 2045-56.
- Powell, D. W.** (1981). Barrier function of epithelia. *Am J Physiol* **241**, G275-88.
- Pruenster, M., Wilflingseder, D., Banki, Z., Ammann, C. G., Muellauer, B., Meyer, M., Speth, C., Dierich, M. P. and Stoiber, H.** (2005). C-type lectin-independent interaction of complement opsonized HIV with monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* **35**, 2691-8.
- Pu, H., Tian, J., Andras, I. E., Hayashi, K., Flora, G., Hennig, B. and Toborek, M.** (2005). HIV-1 Tat protein-induced alterations of ZO-1 expression are mediated by redox-regulated ERK 1/2 activation. *J Cereb Blood Flow Metab* **25**, 1325-35.
- Pudney, J., Quayle, A. J. and Anderson, D. J.** (2005). Immunological microenvironments in the human vagina and cervix: mediators of cellular immunity are concentrated in the cervical transformation zone. *Biol Reprod* **73**, 1253-63.
- Pulendran, B.** (2005). Variiegation of the immune response with dendritic cells and pathogen recognition receptors. *J Immunol* **174**, 2457-65.
- Pummi, K., Malminen, M., Aho, H., Karvonen, S. L., Peltonen, J. and Peltonen, S.** (2001). Epidermal tight junctions: ZO-1 and occludin are expressed in mature, developing, and affected skin and in vitro differentiating keratinocytes. *J Invest Dermatol* **117**, 1050-8.
- Pure, E., Inaba, K., Crowley, M. T., Tardelli, L., Witmer-Pack, M. D., Ruberti, G., Fathman, G. and Steinman, R. M.** (1990). Antigen processing by epidermal Langerhans cells correlates with the level of biosynthesis of major histocompatibility complex class II molecules and expression of invariant chain. *J Exp Med* **172**, 1459-69.
- Purtscher, M., Trkola, A., Gruber, G., Buchacher, A., Predl, R., Steindl, F., Tauer, C., Berger, R., Barrett, N., Jungbauer, A. et al.** (1994). A broadly neutralizing human monoclonal antibody against gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**, 1651-8.
- Qi, H., Denning, T. L. and Soong, L.** (2003). Differential induction of interleukin-10 and interleukin-12 in dendritic cells by microbial toll-like receptor activators and skewing of T-cell cytokine profiles. *Infect Immun* **71**, 3337-42.
- Quayle, A. J., Xu, C., Mayer, K. H. and Anderson, D. J.** (1997). T lymphocytes and macrophages, but not motile spermatozoa, are a significant source of human immunodeficiency virus in semen. *J Infect Dis* **176**, 960-8.
- Querec, T., Bennouna, S., Alkan, S., Laouar, Y., Gorden, K., Flavell, R., Akira, S., Ahmed, R. and Pulendran, B.** (2006). Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *J Exp Med* **203**, 413-24.

Quinones-Mateu, M. E., Lederman, M. M., Feng, Z., Chakraborty, B., Weber, J., Rangel, H. R., Marotta, M. L., Mirza, M., Jiang, B., Kiser, P. et al. (2003). Human epithelial beta-defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication. *Aids* **17**, F39-48.

Qureshi, M. N., Barr, C. E., Hewlitt, I., Boorstein, R., Kong, F., Bagasra, O., Bobroski, L. E. and Joshi, B. (1997). Detection of HIV in oral mucosal cells. *Oral Dis* **3 Suppl 1**, S73-8.

Qureshi, S. T., Lariviere, L., Leveque, G., Clermont, S., Moore, K. J., Gros, P. and Malo, D. (1999). Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med* **189**, 615-25.

-R-

Rajasekaran, A. K., Hojo, M., Huima, T. and Rodriguez-Boulan, E. (1996). Catenins and zonula occludens-1 form a complex during early stages in the assembly of tight junctions. *J Cell Biol* **132**, 451-63.

Randolph, G. J., Beaulieu, S., Lebecque, S., Steinman, R. M. and Muller, W. A. (1998). Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* **282**, 480-3.

Randolph, G. J., Sanchez-Schmitz, G., Liebman, R. M. and Schakel, K. (2002). The CD16(+) (FcγRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *J Exp Med* **196**, 517-27.

Rappersberger, K., Gartner, S., Schenk, P., Stingl, G., Groh, V., Tschachler, E., Mann, D. L., Wolff, K., Konrad, K. and Popovic, M. (1988). Langerhans' cells are an actual site of HIV-1 replication. *Intervirology* **29**, 185-94.

Reece, J. C., Handley, A. J., Anstee, E. J., Morrison, W. A., Crowe, S. M. and Cameron, P. U. (1998). HIV-1 selection by epidermal dendritic cells during transmission across human skin. *J Exp Med* **187**, 1623-31.

Reeves, J. D. and Piefer, A. J. (2005). Emerging drug targets for antiretroviral therapy. *Drugs* **65**, 1747-66.

Regnault, A., Lankar, D., Lacabanne, V., Rodriguez, A., Thery, C., Rescigno, M., Saito, T., Verbeek, S., Bonnerot, C., Ricciardi-Castagnoli, P. et al. (1999). Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med* **189**, 371-80.

Reid, C. D., Stackpole, A., Meager, A. and Tikerpae, J. (1992). Interactions of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD34+ progenitors in human bone marrow. *J Immunol* **149**, 2681-8.

Reis e Sousa, C. (2004). Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin Immunol* **16**, 27-34.

Reis e Sousa, C., Stahl, P. D. and Austyn, J. M. (1993). Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J Exp Med* **178**, 509-19.

Renn, C. N., Sanchez, D. J., Ochoa, M. T., Legaspi, A. J., Oh, C. K., Liu, P. T., Krutzik, S. R., Sieling, P. A., Cheng, G. and Modlin, R. L. (2006). TLR activation of Langerhans cell-like dendritic cells triggers an antiviral immune response. *J Immunol* **177**, 298-305.

Rescigno, M., Citterio, S., Thery, C., Rittig, M., Medaglini, D., Pozzi, G., Amigorena, S. and Ricciardi-Castagnoli, P. (1998). Bacteria-induced neo-biosynthesis, stabilization, and surface expression of functional class I molecules in mouse dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5229-34.

Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J. P. and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* **2**, 361-7.

Rimoldi, M., Chieppa, M., Salucci, V., Avogadri, F., Sonzogni, A., Sampietro, G. M., Nespoli, A., Viale, G., Allavena, P. and Rescigno, M. (2005). Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol* **6**, 507-14.

Ritter, U., Meissner, A., Scheidig, C. and Korner, H. (2004). CD8 alpha- and Langerin-negative dendritic cells, but not Langerhans cells, act as principal antigen-presenting cells in leishmaniasis. *Eur J Immunol* **34**, 1542-50.

Robinson, S. P., Patterson, S., English, N., Davies, D., Knight, S. C. and Reid, C. D. (1999). Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur J Immunol* **29**, 2769-78.

Rogers, N. C., Slack, E. C., Edwards, A. D., Nolte, M. A., Schulz, O., Schweighoffer, E., Williams, D. L., Gordon, S., Tybulewicz, V. L., Brown, G. D. et al. (2005). Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* **22**, 507-17.

Romagnani, S. (1991). Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. *Immunol Today* **12**, 256-7.

Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kampgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P. O., Steinman, R. M. and Schuler, G. (1994). Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* **180**, 83-93.

Romani, N., Holzmann, S., Tripp, C. H., Koch, F. and Stoitzner, P. (2003). Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis. *Apms* **111**, 725-40.

Ronald, A., Ndinya-achola, J. O., Ngugi, E. N., Moses, S., Brunham, R. and Plummer, F. A. (1991). Social epidemiology in Africa: slowing the heterosexual transmission of AIDS. *AIDS Soc* **2**, 7-8.

Ronger-Savle, S., Valladeau, J., Claudy, A., Schmitt, D., Peguet-Navarro, J., Dezutter-Dambuyant, C., Thomas, L. and Jullien, D. (2005). TGFbeta inhibits CD1d expression on dendritic cells. *J Invest Dermatol* **124**, 116-8.

Rosario, M. C., Jacqmin, P., Dorr, P., van der Ryst, E. and Hitchcock, C. (2005). A pharmacokinetic-pharmacodynamic disease model to predict in vivo antiviral activity of maraviroc. *Clin Pharmacol Ther* **78**, 508-19.

Rosenzweig, M., Camus, S., Guigon, M. and Gluckman, J. C. (1998). The influence of interleukin (IL)-4, IL-13, and Flt3 ligand on human dendritic cell differentiation from cord blood CD34+ progenitor cells. *Exp Hematol* **26**, 63-72.

Rosenzweig, M., Canque, B. and Gluckman, J. C. (1996). Human dendritic cell differentiation pathway from CD34+ hematopoietic precursor cells. *Blood* **87**, 535-44.

Rothenfusser, S., Goutagny, N., DiPerna, G., Gong, M., Monks, B. G., Schoenemeyer, A., Yamamoto, M., Akira, S. and Fitzgerald, K. A. (2005). The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J Immunol* **175**, 5260-8.

Rottingen, J. A., Cameron, D. W. and Garnett, G. P. (2001). A systematic review of the epidemiologic interactions between classic sexually transmitted diseases and HIV: how much really is known? *Sex Transm Dis* **28**, 579-97.

Roy, S., Gourde, P., Piret, J., Desormeaux, A., Lamontagne, J., Haineault, C., Omar, R. F. and Bergeron, M. G. (2001). Thermoreversible gel formulations containing sodium lauryl sulfate or n-Lauroylsarcosine as potential topical microbicides against sexually transmitted diseases. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 1671-81.

Rucker, J., Edinger, A. L., Sharron, M., Samson, M., Lee, B., Berson, J. F., Yi, Y., Margulies, B., Collman, R. G., Doranz, B. J. et al. (1997). Utilization of chemokine receptors, orphan receptors, and herpesvirus-encoded receptors by diverse human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol* **71**, 8999-9007.

-S-

Saijo, S., Fujikado, N., Furuta, T., Chung, S. H., Kotaki, H., Seki, K., Sudo, K., Akira, S., Adachi, Y., Ohno, N. et al. (2007). Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nat Immunol* **8**, 39-46.

Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J. D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T. and Tsukita, S. (2000). Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* **11**, 4131-42.

Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* **179**, 1109-18.

Samson, M., Edinger, A. L., Stordeur, P., Rucker, J., Verhasselt, V., Sharron, M., Govaerts, C., Mollereau, C., Vassart, G., Doms, R. W. et al. (1998). ChemR23, a putative chemoattractant receptor, is expressed in monocyte-derived dendritic cells and macrophages and is a coreceptor for SIV and some primary HIV-1 strains. *Eur J Immunol* **28**, 1689-700.

Samson, M., Libert, F., Doranz, B. J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C. M., Saragosti, S., Lapoumeroulie, C., Cognaux, J., Forceille, C. et al. (1996). Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* **382**, 722-5.

Sanders, R. W., de Jong, E. C., Baldwin, C. E., Schuitemaker, J. H., Kapsenberg, M. L. and Berkhout, B. (2002). Differential transmission of human immunodeficiency virus type 1 by distinct subsets of effector dendritic cells. *J Virol* **76**, 7812-21.

Sankala, M., Brannstrom, A., Schulthess, T., Bergmann, U., Morgunova, E., Engel, J., Tryggvason, K. and Pikkarainen, T. (2002). Characterization of recombinant soluble macrophage scavenger receptor MARCO. *J Biol Chem* **277**, 33378-85.

Saphire, A. C., Bobardt, M. D., Zhang, Z., David, G. and Gallay, P. A. (2001). Syndecans serve as attachment receptors for human immunodeficiency virus type 1 on macrophages. *J Virol* **75**, 9187-200.

- Sasaki, H., Matsui, C., Furuse, K., Mimori-Kiyosue, Y., Furuse, M. and Tsukita, S. (2003). Dynamic behavior of paired claudin strands within apposing plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3971-6.
- Sato, A. and Iwasaki, A. (2004). Induction of antiviral immunity requires Toll-like receptor signaling in both stromal and dendritic cell compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16274-9.
- Sato, A., Linehan, M. M. and Iwasaki, A. (2006). Dual recognition of herpes simplex viruses by TLR2 and TLR9 in dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17343-8.
- Sattentau, Q. J., Clapham, P. R., Weiss, R. A., Beverley, P. C., Montagnier, L., Alhalabi, M. F., Gluckmann, J. C. and Klatzmann, D. (1988). The human and simian immunodeficiency viruses HIV-1, HIV-2 and SIV interact with similar epitopes on their cellular receptor, the CD4 molecule. *Aids* **2**, 101-5.
- Sattentau, Q. J. and Weiss, R. A. (1988). The CD4 antigen: physiological ligand and HIV receptor. *Cell* **52**, 631-3.
- Sawamura, T., Kume, N., Aoyama, T., Moriwaki, H., Hoshikawa, H., Aiba, Y., Tanaka, T., Miwa, S., Katsura, Y., Kita, T. et al. (1997). An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature* **386**, 73-7.
- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R. M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R. and Vitelli, A. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *Embo J* **21**, 5017-25.
- Schaerli, P., Willmann, K., Ebert, L. M., Walz, A. and Moser, B. (2005). Cutaneous CXCL14 targets blood precursors to epidermal niches for Langerhans cell differentiation. *Immunity* **23**, 331-42.
- Schakel, K., Kannagi, R., Kniep, B., Goto, Y., Mitsuoka, C., Zwirner, J., Soruri, A., von Kietzell, M. and Rieber, E. (2002). 6-Sulfo LacNAc, a novel carbohydrate modification of PSGL-1, defines an inflammatory type of human dendritic cells. *Immunity* **17**, 289-301.
- Schakel, K., von Kietzell, M., Hansel, A., Ebling, A., Schulze, L., Haase, M., Semmler, C., Sarfati, M., Barclay, A. N., Randolph, G. J. et al. (2006). Human 6-sulfo LacNAc-expressing dendritic cells are principal producers of early interleukin-12 and are controlled by erythrocytes. *Immunity* **24**, 767-77.
- Schluter, H., Wepf, R., Moll, I. and Franke, W. W. (2004). Sealing the live part of the skin: the integrated meshwork of desmosomes, tight junctions and curvilinear ridge structures in the cells of the uppermost granular layer of the human epidermis. *Eur J Cell Biol* **83**, 655-65.
- Schmitt, N., Cumont, M. C., Nugeyre, M. T., Hurtrel, B., Barre-Sinoussi, F., Scott-Algara, D. and Israel, N. (2007). Ex vivo characterization of human thymic dendritic cell subsets. *Immunobiology* **212**, 167-77.
- Schmitt, N., Nugeyre, M. T., Scott-Algara, D., Cumont, M. C., Barre-Sinoussi, F., Pancino, G. and Israel, N. (2006). Differential susceptibility of human thymic dendritic cell subsets to X4 and R5 HIV-1 infection. *Aids* **20**, 533-42.
- Schnurr, M., Chen, Q., Shin, A., Chen, W., Toy, T., Jenderek, C., Green, S., Miloradovic, L., Drane, D., Davis, I. D. et al. (2005). Tumor antigen processing and presentation depend critically on dendritic cell type and the mode of antigen delivery. *Blood* **105**, 2465-72.
- Schols, D., Este, J. A., Henson, G. and De Clercq, E. (1997a). Bicyclams, a class of potent anti-HIV agents, are targeted at the HIV coreceptor fusin/CXCR-4. *Antiviral Res* **35**, 147-56.
- Schols, D., Struyf, S., Van Damme, J., Este, J. A., Henson, G. and De Clercq, E. (1997b). Inhibition of T-tropic HIV strains by selective antagonization of the chemokine receptor CXCR4. *J Exp Med* **186**, 1383-8.
- Schuler, G. and Steinman, R. M. (1985). Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med* **161**, 526-46.
- Schwartz-Cornil, I., Epardaud, M. and Bonneau, M. (2006). Cervical duct cannulation in sheep for collection of afferent lymph dendritic cells from head tissues. *Nat Protoc* **1**, 874-9.
- Seed, J., Allen, S., Mertens, T., Hudes, E., Serufulira, A., Carael, M., Karita, E., Van de Perre, P. and Nsengumuremyi, F. (1995). Male circumcision, sexually transmitted disease, and risk of HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **8**, 83-90.
- Sepulveda-Merrill, C., Mayall, S., Hamblin, A. S. and Breathnach, S. M. (1994). Antigen-presenting capacity in normal human dermis is mainly subserved by CD1a+ cells. *Br J Dermatol* **131**, 15-22.
- Shen, L. and Rock, K. L. (2006). Priming of T cells by exogenous antigen cross-presented on MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol* **18**, 85-91.
- Sheppard, H. W., Celum, C., Michael, N. L., O'Brien, S., Dean, M., Carrington, M., Dondero, D. and Buchbinder, S. P. (2002). HIV-1 infection in individuals with the CCR5-Delta32/Delta32 genotype: acquisition of syncytium-inducing virus at seroconversion. *J Acquir Immune Defic Syndr* **29**, 307-13.
- Shimaoka, T., Kume, N., Minami, M., Hayashida, K., Kataoka, H., Kita, T. and Yonehara, S. (2000). Molecular cloning of a novel scavenger receptor for oxidized low density lipoprotein, SR-PSOX, on macrophages. *J Biol Chem* **275**, 40663-6.
- Shimaoka, T., Kume, N., Minami, M., Hayashida, K., Sawamura, T., Kita, T. and Yonehara, S. (2001). LOX-1 supports adhesion of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Immunol* **166**, 5108-14.

- Shimaoka, T., Nakayama, T., Fukumoto, N., Kume, N., Takahashi, S., Yamaguchi, J., Minami, M., Hayashida, K., Kita, T., Ohsumi, J. et al. (2004). Cell surface-anchored SR-PSOX/CXC chemokine ligand 16 mediates firm adhesion of CXC chemokine receptor 6-expressing cells. *J Leukoc Biol* **75**, 267-74.
- Shimaoka, T., Nakayama, T., Kume, N., Takahashi, S., Yamaguchi, J., Minami, M., Hayashida, K., Kita, T., Ohsumi, J., Yoshie, O. et al. (2003). Cutting edge: SR-PSOX/CXC chemokine ligand 16 mediates bacterial phagocytosis by APCs through its chemokine domain. *J Immunol* **171**, 1647-51.
- Shortman, K. and Naik, S. H. (2007). Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* **7**, 19-30.
- Si, Z., Madani, N., Cox, J. M., Chruma, J. J., Klein, J. C., Schon, A., Phan, N., Wang, L., Biorn, A. C., Cocklin, S. et al. (2004). Small-molecule inhibitors of HIV-1 entry block receptor-induced conformational changes in the viral envelope glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 5036-41.
- Siebers, A. and Finlay, B. B. (1996). M cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infections. *Trends Microbiol* **4**, 22-9.
- Siegfried, N., Muller, M., Deeks, J., Volmink, J., Egger, M., Low, N., Walker, S. and Williamson, P. (2005). HIV and male circumcision--a systematic review with assessment of the quality of studies. *Lancet Infect Dis* **5**, 165-73.
- Siena, S., Di Nicola, M., Bregni, M., Mortarini, R., Anichini, A., Lombardi, L., Ravagnani, F., Parmiani, G. and Gianni, A. M. (1995). Massive ex vivo generation of functional dendritic cells from mobilized CD34+ blood progenitors for anticancer therapy. *Exp Hematol* **23**, 1463-71.
- Simionescu, M. and Simionescu, N. (1991). Endothelial transport of macromolecules: transcytosis and endocytosis. A look from cell biology. *Cell Biol Rev* **25**, 1-78.
- Simoes, J. A., Citron, D. M., Aroutcheva, A., Anderson, R. A., Jr., Chany, C. J., 2nd, Waller, D. P., Faro, S. and Zaneveld, L. J. (2002). Two novel vaginal microbicides (polystyrene sulfonate and cellulose sulfate) inhibit Gardnerella vaginalis and anaerobes commonly associated with bacterial vaginosis. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 2692-5.
- Sivard, P., Berlier, W., Picard, B., Sabido, O., Genin, C. and Misery, L. (2004). HIV-1 infection of Langerhans cells in a reconstructed vaginal mucosa. *J Infect Dis* **190**, 227-35.
- Sivard, P., Dezutter-Dambuyant, C., Kanitakis, J., Mosnier, J. F., Hamzeh, H., Bechetoille, N., Berthier, O., Sabido, O., Schmitt, D., Genin, C. et al. (2003). In vitro reconstructed mucosa-integrating Langerhans' cells. *Exp Dermatol* **12**, 346-55.
- Slack, E. C., Robinson, M. J., Hernanz-Falcon, P., Brown, G. D., Williams, D. L., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V. L. and Reis e Sousa, C. (2007). Syk-dependent ERK activation regulates IL-2 and IL-10 production by DC stimulated with zymosan. *Eur J Immunol* **37**, 1600-12.
- Smed-Sorensen, A., Lore, K., Vasudevan, J., Louder, M. K., Andersson, J., Mascola, J. R., Spetz, A. L. and Koup, R. A. (2005). Differential susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection of myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J Virol* **79**, 8861-9.
- Smed-Sorensen, A., Lore, K., Walther-Jallow, L., Andersson, J. and Spetz, A. L. (2004). HIV-1-infected dendritic cells up-regulate cell surface markers but fail to produce IL-12 p70 in response to CD40 ligand stimulation. *Blood* **104**, 2810-7.
- Smith, S. M., Baskin, G. B. and Marx, P. A. (2000). Estrogen protects against vaginal transmission of simian immunodeficiency virus. *J Infect Dis* **182**, 708-15.
- Soilleux, E. J., Morris, L. S., Leslie, G., Chehimi, J., Luo, Q., Levroney, E., Trowsdale, J., Montaner, L. J., Doms, R. W., Weissman, D. et al. (2002). Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro. *J Leukoc Biol* **71**, 445-57.
- Song, P. I., Park, Y. M., Abraham, T., Harten, B., Zivony, A., Neparidze, N., Armstrong, C. A. and Ansel, J. C. (2002). Human keratinocytes express functional CD14 and toll-like receptor 4. *J Invest Dermatol* **119**, 424-32.
- Sontheimer, R. D., Matsubara, T. and Seelig, L. L., Jr. (1989). A macrophage phenotype for a constitutive, class II antigen-expressing, human dermal perivascular dendritic cell. *J Invest Dermatol* **93**, 154-9.
- Soumelis, V., Reche, P. A., Kanzler, H., Yuan, W., Edward, G., Homey, B., Gilliet, M., Ho, S., Antonenko, S., Lauerma, A. et al. (2002). Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* **3**, 673-80.
- Soumelis, V., Scott, I., Gheyas, F., Bouhour, D., Cozon, G., Cotte, L., Huang, L., Levy, J. A. and Liu, Y. J. (2001). Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood* **98**, 906-12.
- Spira, A. I., Marx, P. A., Patterson, B. K., Mahoney, J., Koup, R. A., Wolinsky, S. M. and Ho, D. D. (1996). Cellular targets of infection and route of viral dissemination after an intravaginal inoculation of simian immunodeficiency virus into rhesus macaques. *J Exp Med* **183**, 215-25.

- Stambach, N. S. and Taylor, M. E.** (2003). Characterization of carbohydrate recognition by langerin, a C-type lectin of Langerhans cells. *Glycobiology* **13**, 401-10.
- Steinman, R. M.** (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* **9**, 271-96.
- Steinman, R. M. and Cohn, Z. A.** (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* **137**, 1142-62.
- Steinman, R. M., Lustig, D. S. and Cohn, Z. A.** (1974). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. *J Exp Med* **139**, 1431-45.
- Stevenson, B. R., Siliciano, J. D., Mooseker, M. S. and Goodenough, D. A.** (1986). Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* **103**, 755-66.
- Stoiber, H., Clivio, A. and Dierich, M. P.** (1997). Role of complement in HIV infection. *Annu Rev Immunol* **15**, 649-74.
- Strunk, D., Rappersberger, K., Egger, C., Strobl, H., Kromer, E., Elbe, A., Maurer, D. and Stingl, G.** (1996). Generation of human dendritic cells/Langerhans cells from circulating CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* **87**, 1292-302.
- Sugaya, M., Hartley, O., Root, M. J. and Blauvelt, A.** (2007). C34, a membrane fusion inhibitor, blocks HIV infection of langerhans cells and viral transmission to T cells. *J Invest Dermatol* **127**, 1436-43.
- Sugita, K., Kabashima, K., Atarashi, K., Shimauchi, T., Kobayashi, M. and Tokura, Y.** (2007). Innate immunity mediated by epidermal keratinocytes promotes acquired immunity involving Langerhans cells and T cells in the skin. *Clin Exp Immunol* **147**, 176-83.
- Summers, K. L., Hock, B. D., McKenzie, J. L. and Hart, D. N.** (2001). Phenotypic characterization of five dendritic cell subsets in human tonsils. *Am J Pathol* **159**, 285-95.
- Sung, S. S., Fu, S. M., Rose, C. E., Jr., Gaskin, F., Ju, S. T. and Beaty, S. R.** (2006). A major lung CD103 (alphaE)-beta7 integrin-positive epithelial dendritic cell population expressing Langerin and tight junction proteins. *J Immunol* **176**, 2161-72.
- Szabolcs, P., Moore, M. A. and Young, J. W.** (1995). Expansion of immunostimulatory dendritic cells among the myeloid progeny of human CD34+ bone marrow precursors cultured with c-kit ligand, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and TNF-alpha. *J Immunol* **154**, 5851-61.

-T-

- Tabata, S., Kadowaki, N., Kitawaki, T., Shimaoka, T., Yonehara, S., Yoshie, O. and Uchiyama, T.** (2005). Distribution and kinetics of SR-PSOX/CXCL16 and CXCR6 expression on human dendritic cell subsets and CD4+ T cells. *J Leukoc Biol* **77**, 777-86.
- Tachibana, K., Hirota, S., Iizasa, H., Yoshida, H., Kawabata, K., Kataoka, Y., Kitamura, Y., Matsushima, K., Yoshida, N., Nishikawa, S. et al.** (1998). The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* **393**, 591-4.
- Tada, H., Aiba, S., Shibata, K., Ohteki, T. and Takada, H.** (2005). Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infect Immun* **73**, 7967-76.
- Taha, T. E., Hoover, D. R., Dallabetta, G. A., Kumwenda, N. I., Mtimavalye, L. A., Yang, L. P., Liomba, G. N., Broadhead, R. L., Chipangwi, J. D. and Miotti, P. G.** (1998). Bacterial vaginosis and disturbances of vaginal flora: association with increased acquisition of HIV. *Aids* **12**, 1699-706.
- Takada, H. and Uehara, A.** (2006). Enhancement of TLR-mediated innate immune responses by peptidoglycans through NOD signaling. *Curr Pharm Des* **12**, 4163-72.
- Takahara, K., Yashima, Y., Omatsu, Y., Yoshida, H., Kimura, Y., Kang, Y. S., Steinman, R. M., Park, C. G. and Inaba, K.** (2004). Functional comparison of the mouse DC-SIGN, SIGNR1, SIGNR3 and Langerin, C-type lectins. *Int Immunol* **16**, 819-29.
- Takano, K., Kojima, T., Go, M., Murata, M., Ichimiya, S., Himi, T. and Sawada, N.** (2005). HLA-DR- and CD11c-positive dendritic cells penetrate beyond well-developed epithelial tight junctions in human nasal mucosa of allergic rhinitis. *J Histochem Cytochem* **53**, 611-9.
- Takeuchi, J., Watari, E., Shinya, E., Norose, Y., Matsumoto, M., Seya, T., Sugita, M., Kawana, S. and Takahashi, H.** (2003). Down-regulation of Toll-like receptor expression in monocyte-derived Langerhans cell-like cells: implications of low-responsiveness to bacterial components in the epidermal Langerhans cells. *Biochem Biophys Res Commun* **306**, 674-9.

- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K. and Akira, S.** (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* **11**, 443-51.
- Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P. F., Morr, M., Radolf, J. D., Zychlinsky, A., Takeda, K. and Akira, S.** (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* **13**, 933-40.
- Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R. L. and Akira, S.** (2002). Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* **169**, 10-4.
- Tamura, Y., Osuga, J., Adachi, H., Tozawa, R., Takanezawa, Y., Ohashi, K., Yahagi, N., Sekiya, M., Okazaki, H., Tomita, S. et al.** (2004). Scavenger receptor expressed by endothelial cells I (SREC-I) mediates the uptake of acetylated low density lipoproteins by macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J Biol Chem* **279**, 30938-44.
- Tan, X. and Phillips, D. M.** (1996). Cell-mediated infection of cervix derived epithelial cells with primary isolates of human immunodeficiency virus. *Arch Virol* **141**, 1177-89.
- Tassaneeritthep, B., Burgess, T. H., Granelli-Piperno, A., Trumpfheller, C., Finke, J., Sun, W., Eller, M. A., Pattanapanyasat, K., Sarasombath, S., Birx, D. L. et al.** (2003). DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med* **197**, 823-9.
- Taylor, P. R., Brown, G. D., Reid, D. M., Willment, J. A., Martinez-Pomares, L., Gordon, S. and Wong, S. Y.** (2002). The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol* **169**, 3876-82.
- Taylor, P. R., Tsoni, S. V., Willment, J. A., Dennehy, K. M., Rosas, M., Findon, H., Haynes, K., Steele, C., Botto, M., Gordon, S. et al.** (2007). Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol* **8**, 31-8.
- Tchou, I., Misery, L., Sabido, O., Dezutter-Dambuyant, C., Bourlet, T., Moja, P., Hamzeh, H., Peguet-Navarro, J., Schmitt, D. and Genin, C.** (2001). Functional HIV CXCR4 coreceptor on human epithelial Langerhans cells and infection by HIV strain X4. *J Leukoc Biol* **70**, 313-21.
- Tchou, I., Sabido, O., Lambert, C., Misery, L., Garraud, O. and Genin, C.** (2003). Technique for obtaining highly enriched, quiescent immature Langerhans cells suitable for ex vivo assays. *Immunol Lett* **86**, 7-14.
- Tissari, J., Siren, J., Meri, S., Julkunen, I. and Matikainen, S.** (2005). IFN-alpha enhances TLR3-mediated antiviral cytokine expression in human endothelial and epithelial cells by up-regulating TLR3 expression. *J Immunol* **174**, 4289-94.
- Traver, D., Akashi, K., Manz, M., Merad, M., Miyamoto, T., Engleman, E. G. and Weissman, I. L.** (2000). Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* **290**, 2152-4.
- Triantafilou, M., Gamper, F. G., Haston, R. M., Mouratis, M. A., Morath, S., Hartung, T. and Triantafilou, K.** (2006). Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. *J Biol Chem* **281**, 31002-11.
- Trkola, A., Ketas, T. J., Nagashima, K. A., Zhao, L., Cilliers, T., Morris, L., Moore, J. P., Maddon, P. J. and Olson, W. C.** (2001). Potent, broad-spectrum inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by the CCR5 monoclonal antibody PRO 140. *J Virol* **75**, 579-88.
- Trkola, A., Purtscher, M., Muster, T., Ballaun, C., Buchacher, A., Sullivan, N., Srinivasan, K., Sodroski, J., Moore, J. P. and Katinger, H.** (1996). Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **70**, 1100-8.
- Tsai, C. C., Emau, P., Jiang, Y., Agy, M. B., Shattock, R. J., Schmidt, A., Morton, W. R., Gustafson, K. R. and Boyd, M. R.** (2004). Cyanovirin-N inhibits AIDS virus infections in vaginal transmission models. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**, 11-8.
- Tsai, C. C., Emau, P., Jiang, Y., Tian, B., Morton, W. R., Gustafson, K. R. and Boyd, M. R.** (2003). Cyanovirin-N gel as a topical microbicide prevents rectal transmission of SHIV89.6P in macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses* **19**, 535-41.
- Tseng, S. Y., Otsuji, M., Gorski, K., Huang, X., Slansky, J. E., Pai, S. I., Shalabi, A., Shin, T., Pardoll, D. M. and Tsuchiya, H.** (2001). B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med* **193**, 839-46.
- Turksen, K. and Troy, T. C.** (2002). Permeability barrier dysfunction in transgenic mice overexpressing claudin 6. *Development* **129**, 1775-84.
- Turville, S. G., Arthos, J., Donald, K. M., Lynch, G., Naif, H., Clark, G., Hart, D. and Cunningham, A. L.** (2001). HIV gp120 receptors on human dendritic cells. *Blood* **98**, 2482-8.
- Turville, S. G., Cameron, P. U., Handley, A., Lin, G., Pohlmann, S., Doms, R. W. and Cunningham, A. L.** (2002). Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat Immunol* **3**, 975-83.

Turville, S. G., Santos, J. J., Frank, I., Cameron, P. U., Wilkinson, J., Miranda-Saksena, M., Dable, J., Stossel, H., Romani, N., Piatak, M., Jr. et al. (2004). Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood* **103**, 2170-9.

-U V W-

Uehara, A., Fujimoto, Y., Fukase, K. and Takada, H. (2007). Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines. *Mol Immunol* **44**, 3100-11.

Ugolini, S., Mondor, I. and Sattentau, Q. J. (1999). HIV-1 attachment: another look. *Trends Microbiol* **7**, 144-9.

Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S. and Furuse, M. (2006). ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell* **126**, 741-54.

Valladeau, J., Duvert-Frances, V., Pin, J. J., Dezutter-Dambuyant, C., Vincent, C., Massacrier, C., Vincent, J., Yoneda, K., Banchereau, J., Caux, C. et al. (1999). The monoclonal antibody DCGM4 recognizes Langerin, a protein specific of Langerhans cells, and is rapidly internalized from the cell surface. *Eur J Immunol* **29**, 2695-704.

Valladeau, J., Duvert-Frances, V., Pin, J. J., Kleijmeer, M. J., Ait-Yahia, S., Ravel, O., Vincent, C., Vega, F., Jr., Helms, A., Gorman, D. et al. (2001). Immature human dendritic cells express asialoglycoprotein receptor isoforms for efficient receptor-mediated endocytosis. *J Immunol* **167**, 5767-74.

Valladeau, J., Ravel, O., Dezutter-Dambuyant, C., Moore, K., Kleijmeer, M., Liu, Y., Duvert-Frances, V., Vincent, C., Schmitt, D., Davoust, J. et al. (2000). Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* **12**, 71-81.

van't Wout, A. B., Kootstra, N. A., Mulder-Kampinga, G. A., Albrecht-van Lent, N., Scherpbier, H. J., Veenstra, J., Boer, K., Coutinho, R. A., Miedema, F. and Schuitemaker, H. (1994). Macrophage-tropic variants initiate human immunodeficiency virus type 1 infection after sexual, parenteral, and vertical transmission. *J Clin Invest* **94**, 2060-7.

Van Damme, L., Ramjee, G., Alary, M., Vuylsteke, B., Chandeying, V., Rees, H., Sirivongrangson, P., Mukenge-Tshibaka, L., Ettiegne-Traore, V., Uaheowitchai, C. et al. (2002). Effectiveness of COL-1492, a nonoxynol-9 vaginal gel, on HIV-1 transmission in female sex workers: a randomised controlled trial. *Lancet* **360**, 971-7.

van De Wijgert, J., Fullem, A., Kelly, C., Mehendale, S., Ruggao, S., Kumwenda, N., Chirenje, Z., Joshi, S., Taha, T., Padian, N. et al. (2001). Phase 1 trial of the topical microbicide BufferGel: safety results from four international sites. *J Acquir Immune Defic Syndr* **26**, 21-7.

van der Aar, A. M., Sylva-Steenland, R. M., Bos, J. D., Kapsenberg, M. L., de Jong, E. C. and Teunissen, M. B. (2007). Loss of TLR2, TLR4, and TLR5 on Langerhans cells abolishes bacterial recognition. *J Immunol* **178**, 1986-90.

van der Laan, L. J., Dopp, E. A., Haworth, R., Pikkarainen, T., Kangas, M., Elomaa, O., Dijkstra, C. D., Gordon, S., Tryggvason, K. and Kraal, G. (1999). Regulation and functional involvement of macrophage scavenger receptor MARCO in clearance of bacteria in vivo. *J Immunol* **162**, 939-47.

Van Herrewege, Y., Michiels, J., Waeytens, A., De Boeck, G., Salden, E., Heyndrickx, L., van den Mooter, G., de Bethune, M. P., Andries, K., Lewi, P. et al. (2006). A dual chamber model of female cervical mucosa for the study of HIV transmission and for the evaluation of candidate HIV microbicides. *Antiviral Res.*

Van Itallie, C., Rahner, C. and Anderson, J. M. (2001). Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest* **107**, 1319-27.

van Vliet, S. J., van Liempt, E., Geijtenbeek, T. B. and van Kooyk, Y. (2006). Differential regulation of C-type lectin expression on tolerogenic dendritic cell subsets. *Immunobiology* **211**, 577-85.

Vermi, W., Riboldi, E., Wittamer, V., Gentili, F., Luini, W., Marrelli, S., Vecchi, A., Franssen, J. D., Communi, D., Massardi, L. et al. (2005). Role of ChemR23 in directing the migration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to lymphoid organs and inflamed skin. *J Exp Med* **201**, 509-15.

Viala, J., Chaput, C., Boneca, I. G., Cardona, A., Girardin, S. E., Moran, A. P., Athman, R., Memet, S., Huerre, M. R., Coyle, A. J. et al. (2004). Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol* **5**, 1166-74.

Vidricaire, G., Gauthier, S. and Tremblay, M. J. (2007). HIV-1 Infection of Trophoblasts Is Independent of gp120/CD4 Interactions but Relies on Heparan Sulfate Proteoglycans. *J Infect Dis* **195**, 1461-71.

- Villadangos, J. A., Schnorrer, P. and Wilson, N. S.** (2005). Control of MHC class II antigen presentation in dendritic cells: a balance between creative and destructive forces. *Immunol Rev* **207**, 191-205.
- Vishnyakova, T. G., Bocharov, A. V., Baranova, I. N., Chen, Z., Remaley, A. T., Csako, G., Eggerman, T. L. and Patterson, A. P.** (2003). Binding and internalization of lipopolysaccharide by Cla-1, a human orthologue of rodent scavenger receptor B1. *J Biol Chem* **278**, 22771-80.
- Vishnyakova, T. G., Kurlander, R., Bocharov, A. V., Baranova, I. N., Chen, Z., Abu-Asab, M. S., Tsokos, M., Malide, D., Basso, F., Remaley, A. et al.** (2006). CLA-1 and its splicing variant CLA-2 mediate bacterial adhesion and cytosolic bacterial invasion in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 16888-93.
- Visintin, A., Mazzoni, A., Spitzer, J. H., Wyllie, D. H., Dower, S. K. and Segal, D. M.** (2001). Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol* **166**, 249-55.
- Vitale, M., Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Pende, D., Arico, M., Moretta, L. and Moretta, A.** (2005). NK-dependent DC maturation is mediated by TNF α and IFN γ released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood* **106**, 566-71.
- Voisset, C., Callens, N., Blanchard, E., Op De Beeck, A., Dubuisson, J. and Vu-Dac, N.** (2005). High density lipoproteins facilitate hepatitis C virus entry through the scavenger receptor class B type I. *J Biol Chem* **280**, 7793-9.
- Vyth-Dreese, F. A., DelleMijn, T. A., Majoor, D. and de Jong, D.** (1995). Localization in situ of the costimulatory molecules B7.1, B7.2, CD40 and their ligands in normal human lymphoid tissue. *Eur J Immunol* **25**, 3023-9.
- Wan, H., Winton, H. L., Soeller, C., Taylor, G. W., Gruenert, D. C., Thompson, P. J., Cannell, M. B., Stewart, G. A., Garrod, D. R. and Robinson, C.** (2001). The transmembrane protein occludin of epithelial tight junctions is a functional target for serine peptidases from faecal pellets of *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy* **31**, 279-94.
- Wan, H., Winton, H. L., Soeller, C., Tovey, E. R., Gruenert, D. C., Thompson, P. J., Stewart, G. A., Taylor, G. W., Garrod, D. R., Cannell, M. B. et al.** (1999). Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *J Clin Invest* **104**, 123-33.
- Wang, J. P., Liu, P., Latz, E., Golenbock, D. T., Finberg, R. W. and Libraty, D. H.** (2006). Flavivirus activation of plasmacytoid dendritic cells delineates key elements of TLR7 signaling beyond endosomal recognition. *J Immunol* **177**, 7114-21.
- Warger, T., Hilf, N., Rechtsteiner, G., Haselmayer, P., Carrick, D. M., Jonuleit, H., von Landenberg, P., Rammensee, H. G., Nicchitta, C. V., Radsak, M. P. et al.** (2006). Interaction of TLR2 and TLR4 ligands with the N-terminal domain of Gp96 amplifies innate and adaptive immune responses. *J Biol Chem* **281**, 22545-53.
- Weber, J., Nunn, A., O'Connor, T., Jeffries, D., Kitchen, V., McCormack, S., Stott, J., Almond, N., Stone, A. and Darbyshire, J.** (2001). 'Chemical condoms' for the prevention of HIV infection: evaluation of novel agents against SHIV(89.6PD) in vitro and in vivo. *Aids* **15**, 1563-8.
- Weiss, H. A., Quigley, M. A. and Hayes, R. J.** (2000). Male circumcision and risk of HIV infection in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis. *Aids* **14**, 2361-70.
- Whitmore, M. M., DeVeer, M. J., Edling, A., Oates, R. K., Simons, B., Lindner, D. and Williams, B. R.** (2004). Synergistic activation of innate immunity by double-stranded RNA and CpG DNA promotes enhanced antitumor activity. *Cancer Res* **64**, 5850-60.
- Wiley, R. D. and Gummuluru, S.** (2006). Immature dendritic cell-derived exosomes can mediate HIV-1 trans infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 738-43.
- Wilflingseder, D., Banki, Z., Dierich, M. P. and Stoiber, H.** (2005). Mechanisms promoting dendritic cell-mediated transmission of HIV. *Mol Immunol* **42**, 229-37.
- Wilkinson, D. A., Operskalski, E. A., Busch, M. P., Mosley, J. W. and Koup, R. A.** (1998). A 32-bp deletion within the CCR5 locus protects against transmission of parenterally acquired human immunodeficiency virus but does not affect progression to AIDS-defining illness. *J Infect Dis* **178**, 1163-6.
- Williams, B. G., Lloyd-Smith, J. O., Gouws, E., Hankins, C., Getz, W. M., Hargrove, J., de Zoysa, I., Dye, C. and Auvert, B.** (2006). The potential impact of male circumcision on HIV in Sub-Saharan Africa. *PLoS Med* **3**, e262.
- Willment, J. A., Marshall, A. S., Reid, D. M., Williams, D. L., Wong, S. Y., Gordon, S. and Brown, G. D.** (2005). The human beta-glucan receptor is widely expressed and functionally equivalent to murine Dectin-1 on primary cells. *Eur J Immunol* **35**, 1539-47.
- Witsch, E. J., Peiser, M., Hutloff, A., Buchner, K., Dorner, B. G., Jonuleit, H., Mages, H. W. and Kroczek, R. A.** (2002). ICOS and CD28 reversely regulate IL-10 on re-activation of human effector T cells with mature dendritic cells. *Eur J Immunol* **32**, 2680-6.
- Wittchen, E. S., Haskins, J. and Stevenson, B. R.** (1999). Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. *J Biol Chem* **274**, 35179-85.

Witvrouw, M., Fikkert, V., Hantson, A., Pannecouque, C., O'Keefe B, R., McMahon, J., Stamatatos, L., de Clercq, E. and Bolmstedt, A. (2005). Resistance of human immunodeficiency virus type 1 to the high-mannose binding agents cyanovirin N and concanavalin A. *J Virol* **79**, 7777-84.

Wollenberg, A., Kraft, S., Hanau, D. and Bieber, T. (1996). Immunomorphological and ultrastructural characterization of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema. *J Invest Dermatol* **106**, 446-53.

Wollenberg, A., Mommaas, M., Oppel, T., Schottdorf, E. M., Gunther, S. and Moderer, M. (2002a). Expression and function of the mannose receptor CD206 on epidermal dendritic cells in inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol* **118**, 327-34.

Wollenberg, A., Wagner, M., Gunther, S., Towarowski, A., Tuma, E., Moderer, M., Rothenfusser, S., Wetzel, S., Endres, S. and Hartmann, G. (2002b). Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol* **119**, 1096-102.

Wollenberg, A., Wen, S. and Bieber, T. (1999). Phenotyping of epidermal dendritic cells: clinical applications of a flow cytometric micromethod. *Cytometry* **37**, 147-55.

Wu, L., Bashirova, A. A., Martin, T. D., Villamide, L., Mehlhop, E., Chertov, A. O., Unutmaz, D., Pope, M., Carrington, M. and KewalRamani, V. N. (2002). Rhesus macaque dendritic cells efficiently transmit primate lentiviruses independently of DC-SIGN. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1568-1573.

Wu, L. and KewalRamani, V. N. (2006). Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol* **6**, 859-68.

Wu, Z., Chen, Z. and Phillips, D. M. (2003). Human genital epithelial cells capture cell-free human immunodeficiency virus type 1 and transmit the virus to CD4+ Cells: implications for mechanisms of sexual transmission. *J Infect Dis* **188**, 1473-82.

-X Y Z-

Yan, M., Peng, J., Jabbar, I. A., Liu, X., Filgueira, L., Frazer, I. H. and Thomas, R. (2004). Despite differences between dendritic cells and Langerhans cells in the mechanism of papillomavirus-like particle antigen uptake, both cells cross-prime T cells. *Virology* **324**, 297-310.

Yang, Y., Liu, B., Dai, J., Srivastava, P. K., Zammit, D. J., Lefrancois, L. and Li, Z. (2007). Heat shock protein gp96 is a master chaperone for toll-like receptors and is important in the innate function of macrophages. *Immunity* **26**, 215-26.

Yewdell, J. W., Schubert, U. and Bennink, J. R. (2001). At the crossroads of cell biology and immunology: DRiPs and other sources of peptide ligands for MHC class I molecules. *J Cell Sci* **114**, 845-51.

Yokota, K., Takashima, A., Bergstresser, P. R. and Ariizumi, K. (2001). Identification of a human homologue of the dendritic cell-associated C-type lectin-1, dectin-1. *Gene* **272**, 51-60.

Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y. M., Gale, M., Jr., Akira, S. et al. (2005). Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* **175**, 2851-8.

Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S. and Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* **5**, 730-7.

York, I. A., Chang, S. C., Saric, T., Keys, J. A., Favreau, J. M., Goldberg, A. L. and Rock, K. L. (2002). The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat Immunol* **3**, 1177-84.

Yoshida, H., Kondratenko, N., Green, S., Steinberg, D. and Quehenberger, O. (1998). Identification of the lectin-like receptor for oxidized low-density lipoprotein in human macrophages and its potential role as a scavenger receptor. *Biochem J* **334** (Pt 1), 9-13.

Yoshimura, A., Lien, E., Ingalls, R. R., Tuomanen, E., Dziarski, R. and Golenbock, D. (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.

Zacharopoulos, V. R., Perotti, M. E. and Phillips, D. M. (1997). A role for cell migration in the sexual transmission of HIV-1? *Curr Biol* **7**, 534-7.

Zaitseva, M., Blauvelt, A., Lee, S., Lapham, C. K., Klaus-Kovtun, V., Mostowski, H., Manischewitz, J. and Golding, H. (1997). Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nat Med* **3**, 1369-75.

- Zaitseva, M., Peden, K. and Golding, H.** (2003). HIV coreceptors: role of structure, posttranslational modifications, and internalization in viral-cell fusion and as targets for entry inhibitors. *Biochim Biophys Acta* **1614**, 51-61.
- Zamze, S., Martinez-Pomares, L., Jones, H., Taylor, P. R., Stillion, R. J., Gordon, S. and Wong, S. Y.** (2002). Recognition of bacterial capsular polysaccharides and lipopolysaccharides by the macrophage mannose receptor. *J Biol Chem* **277**, 41613-23.
- Zeng, J., Teng, F., Weinstock, G. M. and Murray, B. E.** (2004a). Translocation of *Enterococcus faecalis* strains across a monolayer of polarized human enterocyte-like T84 cells. *J Clin Microbiol* **42**, 1149-54.
- Zeng, R., Li, X. and Gorodeski, G. I.** (2004b). Estrogen abrogates transcervical tight junctional resistance by acceleration of occludin modulation. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 5145-55.
- Zhang, H., Dornadula, G., Beumont, M., Livornese, L., Jr., Van Uitert, B., Henning, K. and Pomerantz, R. J.** (1998). Human immunodeficiency virus type 1 in the semen of men receiving highly active antiretroviral therapy. *N Engl J Med* **339**, 1803-9.
- Zhang, Z., Schuler, T., Zupancic, M., Wietgreffe, S., Staskus, K. A., Reimann, K. A., Reinhart, T. A., Rogan, M., Cavert, W., Miller, C. J. et al.** (1999). Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells. *Science* **286**, 1353-7.
- Zhao, X., Deak, E., Soderberg, K., Linehan, M., Spezzano, D., Zhu, J., Knipe, D. M. and Iwasaki, A.** (2003). Vaginal submucosal dendritic cells, but not Langerhans cells, induce protective Th1 responses to herpes simplex virus-2. *J Exp Med* **197**, 153-62.
- Zhou, L. J. and Tedder, T. F.** (1995). Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* **154**, 3821-35.
- Zhu, F. G., Reich, C. F. and Pisetsky, D. S.** (2001). The role of the macrophage scavenger receptor in immune stimulation by bacterial DNA and synthetic oligonucleotides. *Immunology* **103**, 226-34.
- Zhu, T., Mo, H., Wang, N., Nam, D. S., Cao, Y., Koup, R. A. and Ho, D. D.** (1993). Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection. *Science* **261**, 1179-81.
- Zimmerli, S. C. and Hauser, C.** (2007). Langerhans Cells and Lymph Node Dendritic Cells Express the Tight Junction Component Claudin-1. *J Invest Dermatol*.
- Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G. and Amigorena, S.** (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* **4**, 594-600.
- Zoetewij, J. P., Golding, H., Mostowski, H. and Blauvelt, A.** (1998). Cytokines regulate expression and function of the HIV coreceptor CXCR4 on human mature dendritic cells. *J Immunol* **161**, 3219-23.
- Zou, Y. R., Kottmann, A. H., Kuroda, M., Taniuchi, I. and Littman, D. R.** (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* **393**, 595-9.
- Zwick, M. B., Labrijn, A. F., Wang, M., Spenlehauer, C., Saphire, E. O., Binley, J. M., Moore, J. P., Stiegler, G., Katinger, H., Burton, D. R. et al.** (2001a). Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *J Virol* **75**, 10892-905.
- Zwick, M. B., Wang, M., Poignard, P., Stiegler, G., Katinger, H., Burton, D. R. and Parren, P. W.** (2001b). Neutralization synergy of human immunodeficiency virus type 1 primary isolates by cocktails of broadly neutralizing antibodies. *J Virol* **75**, 12198-208.

Annexe

RESUME

A l'interface entre l'immunité innée et adaptative, les cellules dendritiques (DC) jouent un rôle clef dans l'induction de la réponse immunitaire. Dans la peau et les muqueuses, deux types de DC sont présentes : les cellules de Langerhans (CL) dans l'épiderme et les épithéliums et les DC dans le derme et le chorion (DDC). Dans une première partie, nous nous sommes intéressées aux DDC humaines, qui contrairement aux CL, restent méconnues. Les principales caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des DDC humaines isolées *ex vivo* à partir de derme humain ont été étudiées et notamment leur expression des récepteurs de l'immunité innée tels que les *Toll Like Receptor* (TLR) ou les lectines de type C. En parallèle, le profil d'expression des TLR par les CL humaines fraîchement isolées a également été analysé. Ainsi, par l'expression différentielle des récepteurs de l'immunité innée, les CL et les DDC joueraient chacune un rôle spécifique dans l'immunité de la peau et des muqueuses. Au sein des muqueuses génitales, plus particulièrement, elles interviennent dans la transmission de l'infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH). Dans une seconde partie, nous avons examiné les événements précoces dans la transmission du VIH à travers la muqueuse vaginale ainsi que le rôle des CL dans ce mécanisme. Pour cela, nous avons développé, à partir de cellules primaires humaines, un modèle de muqueuse vaginale reconstruite intégrant des CL. Nos travaux ont permis de mieux caractériser les populations de DC de la peau et des muqueuses ainsi que leur potentiel rôle dans l'immunité périphérique, ce qui devrait être utile pour le développement de futures thérapies anti-infectieuses dans lesquelles de telles DC sont ciblées.

TITLE: Mechanisms of recognition of danger signals by skin and mucosal dendritic cells : application to the study of HIV infection using a model of vaginal mucosa integrating Langerhans cells.

ABSTRACT

Residing at the interface between innate and adaptative immunity, dendritic cells (DC), and particularly Langerhans cells (LC) of epidermis and epithelia and DC of dermis or lamina propria (DDC), play a key role in the initiation of immune responses. In a first time, we analyzed the main phenotypic and functional characteristics of freshly isolated human dermal DC, as they were still barely studied contrary to human LC. We focused especially on the expression of innate receptors such as Toll Like Receptors (TLR) and C-type lectins. In parallel, TLR expression was also assessed in freshly isolated human LC. Thus, by their differential expression of innate receptors, LC and DDC would play each a specific role in cutaneous and mucosal immunity. Notably, within genital mucosa, they contribute to the transmission of HIV infection. Therefore, in a second time, we examined the early events in HIV entry into the vaginal mucosa and the precise role of LC in this transmission. For that purpose, we developed an *in vitro* model of vaginal mucosa, using human primary vaginal cells, in which LC could be integrated. In conclusion, we provided here a better characterisation of human LC and DDC as well as their potential function in peripheral immunity that should be useful for the development of future immunotherapies in which such DC are targeted.

DISCIPLINE : Immunologie / Biologie cutanée humaine

MOTS-CLES/KEY-WORDS : Peau/*Skin*, Muqueuse/*Mucosa*, Cellule de Langerhans/*Langerhans cell*, Cellule dendritique dermique/*Dermal dendritic cell*, Récepteurs de l'immunité innée/*Innate immunity receptors*, Muqueuse reconstruite/*Reconstructed mucosa*, VIH/*HIV*

LABORATOIRES

Equipe d'Accueil Universitaire EA3732
Pavillon R. Hôpital Edouard Herriot
69003 LYON

INSERM U590
Centre Léon Bérard
28 rue Laennec
69008 LYON