



Propriétés immuno-modulatrices de la flagelline de *Salmonella typhimurium* : impact sur la défense anti-bactérienne et le développement d'adjuvants épithéliaux

Laurye van Maele

► To cite this version:

Laurye van Maele. Propriétés immuno-modulatrices de la flagelline de *Salmonella typhimurium* : impact sur la défense anti-bactérienne et le développement d'adjuvants épithéliaux. Biochimie [q-bio.BM]. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2010. Français. NNT : . tel-00536453

HAL Id: tel-00536453

<https://theses.hal.science/tel-00536453>

Submitted on 16 Nov 2010

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

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

Université du Droit et de la Santé de Lille II

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE II

Discipline : biochimie et biologie moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par

Laurie VAN MAELE

le 29 septembre 2010

**Propriétés immuno-modulatrices de la flagelline
de *Salmonella typhimurium* : impact sur la défense
anti-bactérienne et le développement d'adjuvants épithéliaux**

Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Jean-Paul DESSAINT	Président du Jury
Madame le Docteur Armelle PHALIPON	Rapporteur
Madame le Docteur Lena ALEXOPOULOU	Rapporteur
Monsieur le Docteur Arndt BENECKE	Examineur
Monsieur le Docteur Arnaud DIDIERLAURENT	Examineur
Monsieur le Docteur Jean-Claude SIRARD	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer tout d'abord mes remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie le Professeur Dessaint de me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Je remercie les Docteurs Phalipon et Alexopoulou d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Leurs remarques et suggestions m'ont permis d'apporter des améliorations à la qualité du manuscrit.

Je remercie les Docteurs Benecke et Dididerlaurent d'avoir accepté d'examiner ce travail et de faire parti du jury. Ainsi que pour leur aide dans la réalisation de ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à mon directeur de thèse le Docteur Jean-Claude Sirard pour le temps qu'il a passé à la réalisation de cette thèse. Un grand merci pour vos compétences, tous vos conseils et votre soutien dans les moments de doute. Je vous suis également reconnaissante de m'avoir permis de découvrir la recherche sous d'autres angles, en particulier lors de mon stage en Amérique du Sud.

Je remercie le Professeur Simonet et le Docteur Trottein de m'avoir accueillie au sein de leurs laboratoires.

Je remercie les personnes qui m'ont permis de près ou de loin de mener à bien ce travail. En particulier Delphine Cayet pour son aide précieuse, sa grande expérience, sa générosité et son soutien pendant ces trois années.

Un grand merci à tous les membres de l'ex-unité U801 et aux membres de l'équipe 8 du CIIL pour leur accueil et leur convivialité ; avec une dédicace toute particulière à l'équipe « JCS », Julien, Delphine F, Delphine C et Christophe, ce fut un plaisir de travailler avec vous. Merci également à l'équipe « microarrays » Hélène, Guillaume et Sébastien pour leur gentillesse.

Un merci aux anciens, Sonia, Staëlle et Caro pour leur convivialité et leur bonne humeur.

Un très grand merci à mes amies thésardes, Élise, Anna et Émile pour leur écoute, les moments de complicité au labo et en dehors. Leur présence a permise de surmonter les épreuves difficiles.

Je remercie Benjamin, Emmanuel, Nadine et Christophe pour leur gentillesse et leurs conseils pendant les 3 ans de monïtorat. Ils m'ont transmis leur plaisir d'enseigner.

Finalement, j'adresse un énorme merci à mon fiancé, Damien, qui m'a supporté (je ne sais comment) pendant ces années et a toujours été présent lorsque j'en ai eu besoin.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	1
TABLE DES MATIÈRES.....	3
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	5
INTRODUCTION	6
I- Les récepteurs de la famille "Toll" ou TLR	7
<i>A- La découverte des TLR.....</i>	<i>7</i>
1- De l'immunité des insectes aux mammifères.....	7
2- La notion de "Toll-like Receptor".....	7
3- Le répertoire des TLR chez les mammifères	8
<i>B- La structure et la spécificité des TLR.....</i>	<i>8</i>
1- Le domaine extracellulaire.....	9
2- La nature des motifs microbiens détectés par les TLR	11
3- Le domaine intracellulaire : "Toll/IL-1R domain" ou domaine TIR	11
<i>C- La signalisation TLR</i>	<i>11</i>
1- La réponse immunitaire innée ou réponse pro-inflammatoire	11
2- Une activation transcriptionnelle immédiate.....	12
3- Une régulation négative induite par l'activation des TLR	14
4- Coopération	16
<i>D- Pathologies associés aux TLR.....</i>	<i>16</i>
II- Les TLR dans l'immunité anti-infectieuse des muqueuses	18
<i>A- Organisation et compartimentation des muqueuses</i>	<i>18</i>
<i>B- Mécanismes moléculaires et cellulaires de l'immunité innée muqueuse.....</i>	<i>21</i>
1- Les molécules anti-microbiennes de la défense innée.....	23
2- Le recrutement et l'activation des neutrophiles.....	23
3- Réparation de l'épithélium et intégrité de la défense mécanique	25
<i>C- Réponse adaptative des muqueuses aux pathogènes</i>	<i>26</i>
1- Les cellules présentatrices d'antigènes des muqueuses	28
2- Les TLR contrôlent l'initiation de la réponse lymphocytaire	30
3- Le recrutement des CPA et la migration dans les tissus lymphoïdes	31
4- Compartimentation de la réponse adaptative	32
III- Les cytokines IL-17 et IL-22 : des médiateurs clés de l'immunité des muqueuses	33
<i>A- Structure et fonction des cytokines IL-17 et IL-22</i>	<i>33</i>

1- Le récepteur IL-17R et ses cytokines spécifiques IL-17A et IL-17F	33
2- La cytokine IL-22 et son récepteur épithélial.....	36
<i>B- Les cellules productrices d'IL-17 et d'IL-22</i>	<i>37</i>
<i>C- Contribution des cytokines IL-17 et IL-22 dans l'immunité anti-infectieuse.....</i>	<i>39</i>
IV- La flagelline, un motif bactérien spécifique des muqueuses et de l'immunité	41
<i>A- Structure et fonction du flagelle bactérien</i>	<i>41</i>
<i>B- La flagelline, le motif bactérien agoniste de TLR5.....</i>	<i>43</i>
1- Organisation structurale.....	43
2- Reconnaissance par le TLR5	43
3- Reconnaissance de la flagelline par les NLR.....	44
4- Activité biologique de la flagelline in vivo	45
OBJECTIFS.....	47
RESULTATS	49
L'administration locale de flagelline induit des réponses immunitaires épithéliales.....	49
<i>Article 1</i>	<i>49</i>
<i>Article 2</i>	<i>59</i>
<i>Résultats complémentaires de l'article 2.....</i>	<i>76</i>
L'administration systémique de flagelline induit une réponse innée de type Th17.....	82
<i>Article 3</i>	<i>82</i>
<i>Résultats complémentaires de l'article 3.....</i>	<i>98</i>
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	100
BIBLIOGRAPHIE.....	109

LISTE DES ABRÉVIATIONS

BCL2	"B cell lymphoma 2"
CD	Cluster de différenciation
CLI	Cellule lymphoïde innée
CLR	"C-type lectin receptor"
CPA	Cellule presentatrice d'antigène
DC	Cellules dendritiques
HBD-2	"Human β -defensin-2"
IAP	"Inhibitor of apoptosis"
IFN	Interféron
I κ B α	"Inhibitor of NF- κ B α "
IL	Interleukine
iNKT	"invariant natural Killer T cell"
IPAF	"ICE (IL-1 β -converting enzyme) protease activating factor"
IRAK	"Interleukin-1 receptor-associated kinase"
IRF	"Interferon regulatory factor"
K _d	Constante de dissociation
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	"Leucine-rich repeat"
Mal	"MyD88 adaptor like protein"
MALT	"Mucosa-associated lymphoid tissue"
MAMP	"Microbe-associated molecular pattern"
MAPK	"Mitogen-activated protein kinase"
MPL	"monophosphoryl lipid A"
MyD88	"Myeloid differentiation primary response protein 88"
NAIP5	"NLR family, apoptosis inhibitory protein 5"
NET	"Neutrophil extracellular trap"
NF- κ B	"Nuclear factor- κ B"
NK	Cellule "Natural Killer"
NLR	"NOD-like receptors"
NOD	"Nucleotide-binding oligomerization domain"
PAMP	"Pathogen-associated molecular pattern"
pDC	Cellules dendritiques plasmacytoïdes
PRR	"Pattern recognition receptor"
PMN	"Polymorphonuclear leukocyte"
RIG-I	"Retinoic acid-inducible gene I"
RLR	"RIG-I-like receptor"
SARM	"sterile α and heat-armorillo motifs"
SEFIR	SEF/IL-17R
TGF	"Transforming growth factor"
Th	"T helper"
TICAM-1	"TIR-containing adaptor molecule-1"
TICAM-2	"TIR-containing adaptor molecule-2"
TIR	Toll/IL-1R
TIRAP	"TIR domain-containing adaptor protein"
TLR	"Toll-like receptor"
TNF	"Tumor necrosis factor"
TRAF	"TNF-receptor-associated factor"
TRAM	"TRIF-related adaptor molecule"
TRIF	"TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon- β "

INTRODUCTION

Continuellement exposé à de nombreux pathogènes présents dans l'environnement, l'organisme doit monter des réponses immunitaires appropriées pour se protéger. La détection des agents infectieux grâce à des récepteurs de l'immunité innée nommés PRR pour "Pattern Recognition Receptor" est l'élément déclencheur de ces réponses. L'immunité innée est immédiate, spécifique, efficace, et produit une défense anti-microbienne à large spectre d'activité. Une centaine de PRR reconnaissent spécifiquement des motifs moléculaires de nature biochimique variée, associés à la pathogénicité, appelés PAMP pour "Pathogen-Associated Molecular Pattern", essentiels pour la plupart à la survie du microorganisme. De manière générale, les PAMP sont des MAMP pour "Microbe-associated Molecular Pattern" terme intégrant les microorganismes commensaux et les pathogènes opportunistes. À ce jour, quatre classes majeures de PRR cellulaires ont été identifiées (Takeuchi et Akira, 2010). Les "Toll-like Receptor" ou TLR ont été les premiers récepteurs décrits et les plus étudiés. Les trois autres familles incluent des détecteurs transmembranaires comme les lectines de type C (CLR), des détecteurs cytoplasmiques comme les "Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like Receptors" (RLR) ou les "Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like Receptors" (NLR) (Figure 1). Ces récepteurs activent un processus de nature inflammatoire pour promouvoir l'élimination des microorganismes, et conditionnent le retour des tissus à l'homéostasie. L'activation des PRR détermine également la réponse adaptative spécifique des antigènes du microorganisme détecté. De nombreuses études se sont intéressées aux rôles immunitaires des PRR au niveau systémique, en particulier le sang, les organes lymphoïdes et le foie, tissus envahis par les pathogènes en cas de septicémies. Cependant, la plupart des microorganismes commensaux, opportunistes ou pathogènes colonisent et/ou ciblent les muqueuses. Au cours de ce travail de thèse, je me suis donc intéressée à l'implication des TLR dans l'immunité anti-infectieuse au niveau des muqueuses.

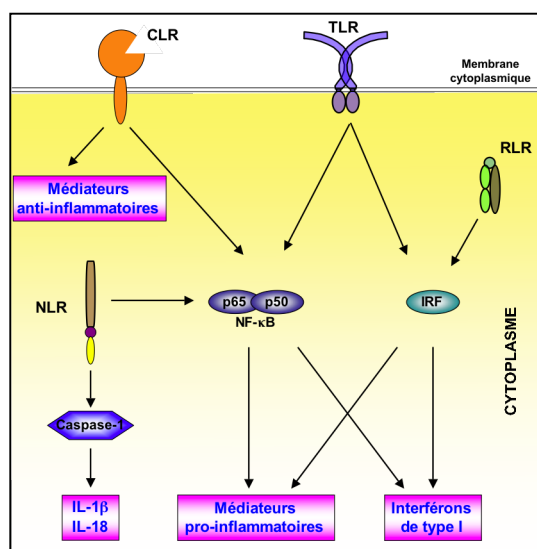


Figure 1 : Les quatre familles de détecteurs cellulaires de l'immunité innée.

Les "Toll-like Receptor" ou TLR et les "C-type lectin" ou CLR sont des protéines transmembranaires. Les "NOD-like Receptor" ou NLR et les "RIG-I-like Receptor" ou RLR sont des protéines cytoplasmiques. Après détections des signaux de dangers d'origine microbienne ("microbe-associated molecular pattern"), ces récepteurs de l'immunité innée activent des cascades de signalisation induisant l'activation des interleukines IL-1β et IL-18 par la Caspase 1 pour les voies dépendantes des NLR, de médiateurs pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires ou d'interférons de type I pour les autres récepteurs. Ces différentes molécules participent ainsi à l'élaboration des défenses immunitaires anti-microbiennes. Ces récepteurs peuvent également reconnaître des signaux endogènes de l'hôte suite à une lésion ou un stress non microbien.

I- Les récepteurs de la famille "Toll" ou TLR

Les récepteurs TLR constituent une famille de PRR très conservées au cours de l'évolution. Ils sont retrouvés autant chez les invertébrés comme la drosophile que chez les différentes espèces de vertébrés tels les poissons, la poule, la souris, ou l'Homme et participent au déclenchement de l'immunité.

A- La découverte des TLR

1- De l'immunité des insectes aux mammifères

La découverte de la famille TLR a débuté avec l'identification du récepteur Toll chez la mouche du vinaigre, *Drosophila melanogaster*. En 1985, le gène *Toll* est isolé pour la première fois. Étudiant les facteurs maternels impliqués dans le processus d'embryogénèse chez *D. melanogaster*, le groupe de Nüsslein-Volhard montre que Toll permet la mise en place d'un gradient morphogène de l'axe dorso-ventral chez les embryons de mouche (Anderson *et al.*, 1985). Toll est une protéine transmembranaire avec un domaine cytoplasmique responsable de la signalisation (Morisato et Anderson, 1995). Par la suite, Anderson et son équipe isolent les protéines impliquées dans la cascade de signalisation de Toll (Belvin et Anderson, 1996). En 1996, les travaux du groupe d'Hoffman montrent que les composants de la voie activant le facteur de transcription NF- κ B chez les mammifères et ceux de la cascade Toll chez la drosophile présentent des ressemblances structurales et fonctionnelles (Lemaitre *et al.*, 1996). En utilisant des mutants du ligand extracellulaire de Toll, Spätzle et de la voie de signalisation, ils démontrent le rôle clé de Toll dans le contrôle de l'expression du gène de la drosomycine, un composé peptidique anti-fongique. Ils observent également que le mutant Toll montre une sensibilité accrue aux infections à *Aspergillus fumigatus*. Toll a donc un rôle dans les défenses innées et permet vraisemblablement la détection des microorganismes pathogènes.

2- La notion de "Toll-like Receptor"

En 1997, le groupe de Janeway identifie un orthologue de Toll chez l'homme nommé h-Toll pour "human Toll" ou Toll-like receptor 4 (TLR4) (Medzhitov *et al.*, 1997). Dans la lignée humaine de monocytes THP-1, TLR4 est capable d'induire la sécrétion d'interleukines inflammatoires (IL-1, IL-6, et IL-8) et l'expression de la molécule de co-stimulation CD80 (B7.1) essentielle à l'activation des cellules T naïves. Ces résultats suggèrent que TLR4 est impliqué dans l'immunité. La notion que des mécanismes immunitaires "ancestraux" sont conservés chez les êtres vivants est ainsi introduite pour la première fois. En 1998, le rôle de TLR4 dans l'immunité est précisé (Poltorak *et al.*, 1998). Une mutation dans le locus *Lps* chez les souris, mutation se trouvant dans le troisième exon du gène *Tlr4*, affecte la transduction du signal engendré par le lipopolysaccharide (LPS), rendant ainsi les animaux

sensibles aux infections par les bactéries à Gram négatif. Les auteurs concluent donc que le récepteur TLR4 reconnaît spécifiquement le LPS. Depuis cette découverte et les avancées en génomique, 13 TLR ont été identifiés chez les mammifères (Roach *et al.*, 2005). Les données de la littérature suggèrent que chaque TLR reconnaît une molécule microbienne bien particulière et apportent la notion que l'immunité innée utilise un système de détection spécifique activant des mécanismes de défense peu spécifiques ou à large spectre d'activité. Les TLR permettent ainsi la transduction des signaux de danger "microbien" en signaux immunologiques de défense.

3- Le répertoire des TLR chez les mammifères

Les TLR sont exprimés par de nombreux type cellulaire incluant les cellules de l'immunité et les cellules structurales (Reed *et al.*, 2002). Les TLR sont ainsi retrouvés chez les acteurs de l'immunité innée (macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques, cellules NK) comme chez les acteurs de l'immunité adaptative (lymphocytes B et T) (Hasan *et al.*, 2005; Kabelitz, 2007). Néanmoins, la distribution des différents TLR au sein de chaque type cellulaire est encore mal décrite. À ce jour, seul le répertoire des cellules dendritiques (DC) est bien documenté. Chez la souris, quatre populations de DC ont été définies sur la base de l'expression du marqueur CD11c. Les DC plasmacytoïdes ou pDC ont peu de CD11c en surface alors que les trois autres populations l'expriment fortement (DC conventionnelles) et se distinguent par la présence de CD8 α , CD4 ou leur absence, i.e. double négatives (DN). Les récepteurs TLR-1, -2, -4, -6, -8 et -9 sont exprimés par toutes les populations, TLR3 est exprimé plus sélectivement par les cellules CD8 α^+ , TLR5 par la population CD4 $^+$ (majoritairement CD11b $^+$) et TLR7 dans les cellules CD4 $^+$ et les pDC (Edwards *et al.*, 2003). L'expression et la fonction des TLR au sein d'une population cellulaire est également dépendante de l'organe auquel est rattaché cette population. Par exemple, les DC conventionnelles de la rate sont stimulées par les agonistes de TLR5 ou TLR4 alors que les cellules équivalentes de *lamina propria* de l'intestin ne répondent qu'à l'agoniste de TLR5 (Uematsu *et al.*, 2006). Ces propriétés permettent de faire la distinction entre les microorganismes selon la cellule et le tissu ciblé.

B- La structure et la spécificité des TLR

Les TLR sont des glycoprotéines transmembranaires de type I constituées d'un domaine extracellulaire qui confère la spécificité de ligand et d'un domaine cytoplasmique de transduction du signal (Figure 2A) (Akira *et al.*, 2006). Les TLR sont fonctionnels sous forme d'homo- ou hétéro-dimères. Deux modèles d'activation par leur ligand MAMP spécifique ont été proposés : (1) les dimères sont préformés et le ligand induit un changement de conformation (Figure 2B) ou (2) les monomères de TLR se dimérisent par interaction avec le ligand.

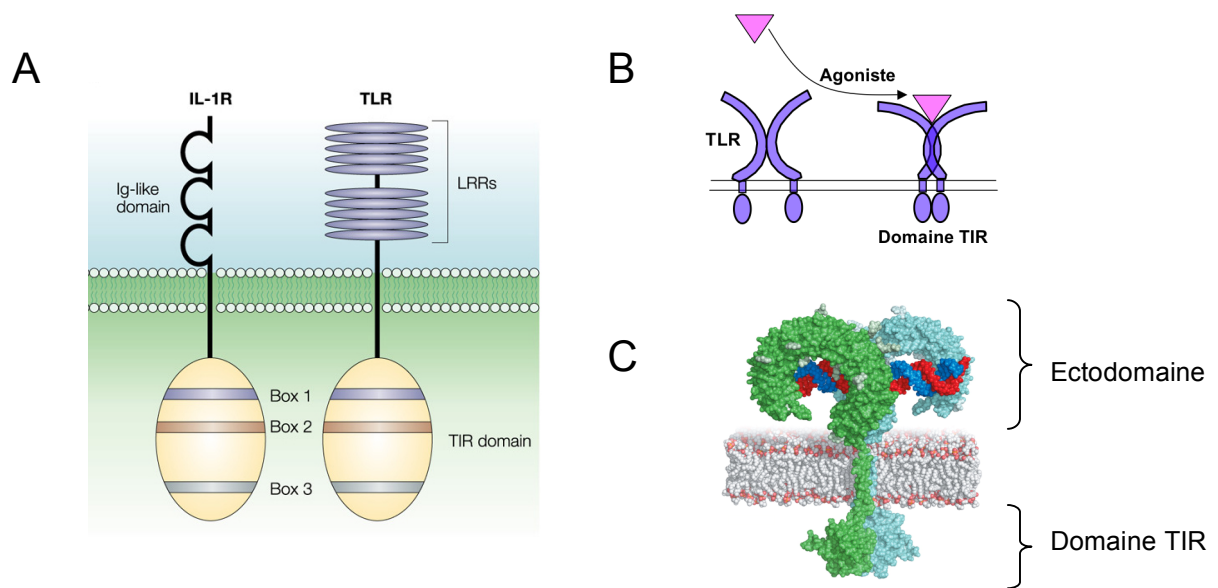


Figure 2 : Représentation schématique de l'organisation structurale des TLR.

(A) Les TLR et le récepteur à l'IL-1 β (IL-1R) ont un domaine cytoplasmique conservé appelé TIR caractérisé par la présence de trois régions homologues "box" 1, 2 et 3. Les "box" 1 et 2 sont impliquées dans l'interaction homotypique avec les domaines TIR des adaptateurs (tels que MyD88 et TRIF). Les domaines extracellulaires des TLRs et IL-1R sont différents : les chaînes de l'IL-1R sont constituées de trois domaines de type immunoglobuline alors que les TLR se composent de répétitions en tandem de régions riches en leucines (LRR). D'après Akira *et al*, 2004 *Nat Rev Immunol*. (B) L'interaction TLR-agoniste. Lors de l'interaction avec son agoniste, un changement de conformation rapproche physiquement les domaines TIR des monomères pour permettre la transduction du signal de danger. (C) Structure tridimensionnelle de TLR3 complexé à de l'ARN double brin (en bleu et rouge). Le site de reconnaissance de l'ARN double brin se localise à l'interface des deux monomères où il est emprisonné. D'après Liu *et al*, Science 2008.

1- Le domaine extracellulaire

Le domaine extracellulaire des TLR est organisé en fer à cheval et permet la reconnaissance spécifique de leur ligand, i.e. MAMP. Il est constitué de nombreux motifs riches en leucines nommé LRR pour "Leucine-Rich Repeat" (Figure 2). Chaque LRR est composée de 24 à 29 acides aminés contenant les motifs XLXXLXLXX et XØXXØX4FXXLX (où X représente n'importe quel acide aminé et Ø un acide aminé hydrophobe) (Bell *et al.*, 2003). Selon les TLR, 19 à 25 motifs LRR en tandem sont retrouvés. Les séquences conservées s'organisent en feuillet β et constituent la partie concave du fer à cheval alors que les boucles variables en forment la partie convexe (Figure 2C) (Choe *et al.*, 2005). Dans le cas de TLR3, cette organisation structurale est nécessaire à l'interaction avec son ligand, les acides ribonucléiques monobrans (Bell *et al.*, 2003). La spécificité des interactions ligand de TLR - récepteur TLR semble importante puisque les affinités sont de l'ordre du nanomolaire (nM). En effet, Spätzle et Toll chez la drosophile ont un K_d de 0,4 nM. De même, l'interaction entre le LPS et son co-facteur MD-2 avec TLR4 présente un K_d de 3nM (Akashi *et al.*, 2003). Malgré toutes les études menées ces 15 dernières années, les paramètres physico-chimiques des interactions des TLR avec leurs ligands demeurent mal

documentés et des études dans ce sens seront essentielles à de nouvelles découvertes sur le mode d'action des TLR.

Récepteurs	Co-Récepteurs	Agonistes	Structure chimique
TLR1/TLR2	CD14	Triacyl lipoprotéine Pam ₃ CysK ₄	Pam3CysK4
TLR2/TLR6	CD14 CD36	zymosan acide lipoteichoïque peptidoglycane	Peptidoglycane (E. coli)
TLR3	ND	ARN double brin poly I:C	Poly I:C
TLR4	CD14 MD2	LPS pneumolysine	LPS
TLR5	ND	flagelline	FliC S. typhimurium
TLR7	ND	ARN simple brin R-848	R-848
TLR8	ND	ARN simple brin R-848	
TLR9	ND	CpG non-méthylé	
TLR10	ND	ND	
TLR11	ND	profilin	
TLR12	ND	ND	
TLR13	ND	ND	

Tableau 1 : Les principaux co-récepteurs et agonistes microbiens de TLR

La structure chimique d'un agoniste (naturel ou synthétique) est représentée pour chaque TLR. (ND : non défini).

2- La nature des motifs microbiens détectés par les TLR

La localisation subcellulaire des TLR est associée à la nature des ligands qu'ils reconnaissent (Tableau 1). Les spécificités de ligand des TLR humains et murins sont très proches. Les TLR-1, -2, -4, -5, -6 et -11 reconnaissent des MAMP exprimés et parfois libérés à la surface des microorganismes tels que des glycolipides, des lipoprotéines et des protéines. Ces récepteurs TLR sont généralement exprimés à la membrane plasmique des cellules pour déterminer la détection des MAMP en surface. Les TLR-3, -7, -8 et -9 reconnaissent des acides nucléiques qui ne peuvent être libérés qu'après une dégradation microbienne au sein d'endosomes ou de lysosomes. Ces TLR sont donc localisés dans les cellules au sein de ces vésicules intracellulaires.

3- Le domaine intracellulaire : "Toll/IL-1R domain" ou domaine TIR

Gay a initialement décrit une homologie importante entre le domaine intracellulaire de Toll chez *D. melanogaster* (Gay et Keith, 1991) et celui des récepteurs à l'interleukine 1 (IL-1R) des mammifères, depuis dénommé TIR pour "Toll/IL-1R" (Slack *et al.*, 2000). La partie cytoplasmique des TLR (environ 200 acides aminés) présente une organisation similaire en domaine TIR (Akira *et al.*, 2006) (Figure 2A). Ainsi, les domaines TIR des TLR présentent environ 20 à 30% d'homologie avec ceux des récepteurs à l'IL-1, l'IL-18 et l'IL-33. Un site privilégié d'interaction homotypique est formé entre les domaines TIR des TLR et des adaptateurs moléculaires. Cette plateforme connecte ainsi les récepteurs à la cascade de signalisation.

C- La signalisation TLR

La réponse médiée par les TLR est caractérisée par une cascade de phosphorylation aboutissant à une activation transcriptionnelle. La signalisation ne nécessite pas de synthèse protéique *de novo*, repose sur la translocation nucléaire quasi-immédiate de régulateurs transcriptionnels et stimule avec une grande amplitude la transcription de gènes de l'immunité. Néanmoins, cette réponse doit rapidement être atténuée pour garantir l'intégrité des cellules activées et des tissus.

1- La réponse immunitaire innée ou réponse pro-inflammatoire

La cascade de signalisation déclenchée par l'activation des TLR induit la transcription de gènes pro-inflammatoires codant des cytokines (IL-6, IL-12, TNF- α , ...), des chimiokines (CXCL1, CXCL8, ...), des molécules anti-microbiennes (défensines, lipocaline 2, ...) et des molécules impliquées dans la survie cellulaire (BCL2, IAP, TGF...) ou la réparation cellulaire et tissulaire (métalloprotéases, cytochromes, facteurs de croissance, ...) (Medzhitov et Horng, 2009). Cet arsenal permet l'expression d'effecteurs immunitaires de la défense anti-infectieuse, de recruter des phagocytes et des cellules immunitaires innées et adaptatives, et d'assurer la mise en place de la réponse adaptative (Figure 3). Au final, la réponse TLR

favorise l'élimination des microorganismes pathogènes tout en préservant l'intégrité fonctionnelle du tissu. Ces effets sur l'immunité seront développés dans le chapitre II.

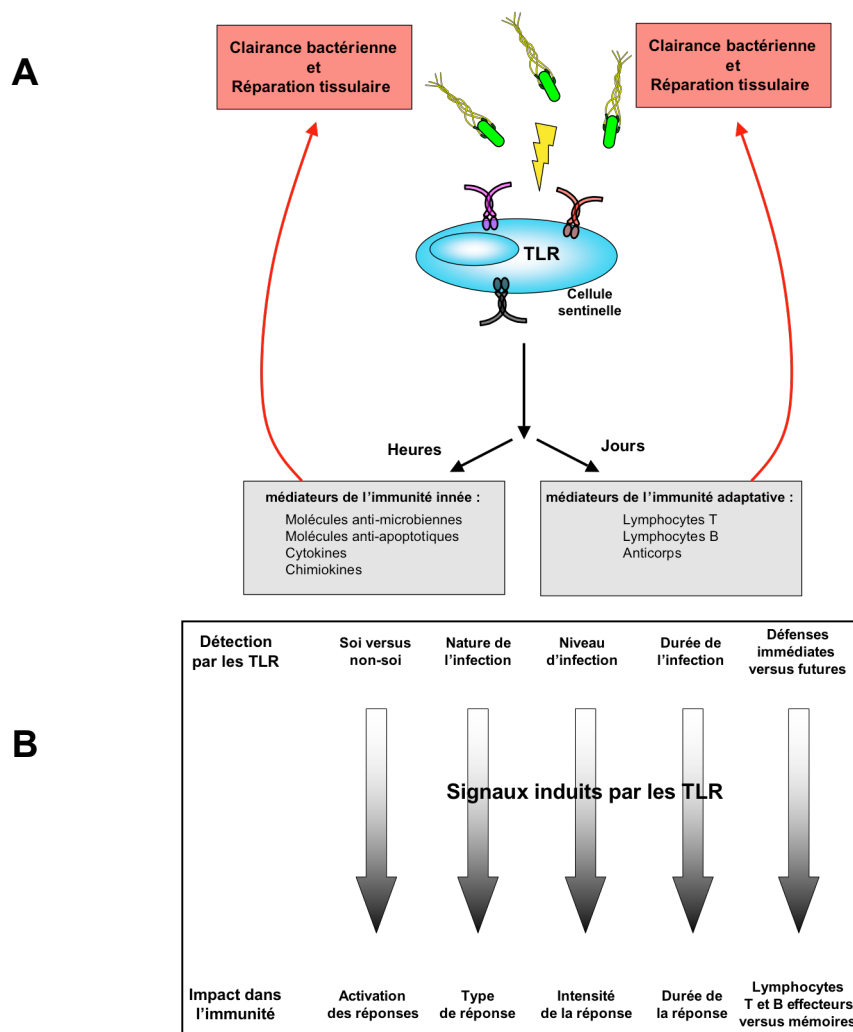


Figure 3: Contribution des TLR dans l'immunité anti-infectieuse

(A) La réponse anti-bactérienne. La détection des bactéries par les TLR présents à la surface des cellules sentinelles active rapidement (quelques heures) l'immunité innée puis l'immunité adaptative (quelques jours). Les médiateurs innés et adaptatifs, induits par la signalisation TLR, ont pour fonction d'éliminer les bactéries et de réparer les tissus abîmés. (B) Détection de l'infection par les TLR et impact pour l'immunité. Les signaux microbiens détectés par les TLR donnent des indices importants sur l'infection et le pathogène associé ce qui permet à l'hôte de développer en retour une réponse immunitaire sur mesure.

D'après Palm et Medzhitov, Immunological Reviews 2009.

2- Une activation transcriptionnelle immédiate

Après détection du MAMP, les homo- ou hétéro-dimères de TLR provoquent le recrutement cytoplasmique d'adaptateurs moléculaires par le domaine TIR et sont ainsi à l'origine de la signalisation immédiate. L'activation de la voie TLR se mesure déjà quelques minutes post-activation. À ce jour, cinq adaptateurs ont été décrits (O'Neill et Bowie, 2007) : le facteur de différenciation myéloïde 88 (MyD88), l'adaptateur contenant le domaine TIR (TIRAP ou Mal), l'adaptateur contenant un domaine TIR induisant l'interféron de type I tel l'IFN- β (TRIF ou TICAM-1), l'adaptateur apparenté à TRIF (TRAM ou TICAM-2) et l'adaptateur contenant les motifs "sterile α " et "Heat-armadillo" (SARM) (Figure 4).

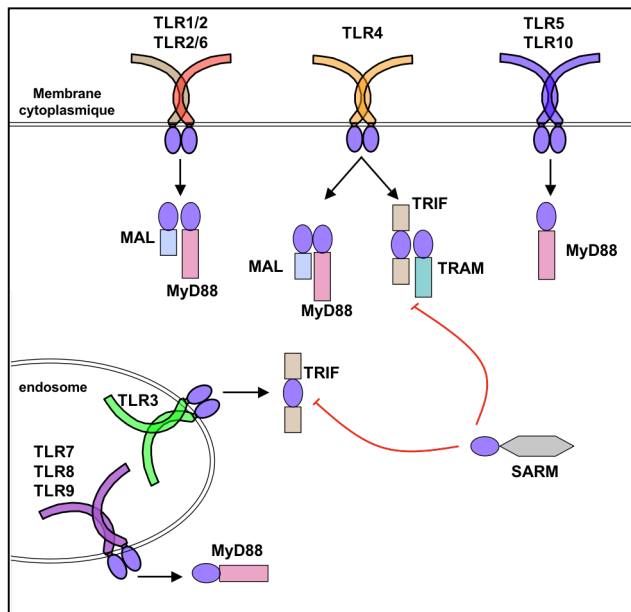


Figure 4 : Les adaptateurs de la signalisation TLR.

Différents adaptateurs sont utilisés par les dimères de TLR pour initier les cascades de signalisation. L'adaptateur principal est MyD88, il est recruté par tous les TLR sauf TLR3. Le second adaptateur principal est TRIF, il est utilisé par TLR3 et TLR4. MAL et TRAM sont des adaptateurs accessoires à MyD88 ou TRIF. En effet, MAL interagit avec MyD88 dans l'activation de TLR1/TLR2 et TLR2/TLR6 et de TLR4, et TRAM s'associe à TRIF pour initier la signalisation par TLR4. SARM est un régulateur négatif de la voie activée par TRIF. Ces combinaisons d'adaptateurs permettent ainsi de limiter le nombre d'acteurs intervenant dans la mise en place de l'immunité innée et de lui donner une signature à la fois caractéristique et modulable. (TLR : Toll-like Receptor, MyD88 : facteur de différenciation myéloïde 88, TRIF : adaptateur contenant un domaine TIR induisant l'interféron de type I, MAL : adaptateur contenant le domaine TIR (ou TIRAP), TRAM : adaptateur apparenté à TRIF, SARM : adaptateur contenant les motifs "sterile α " et "heat-armadillo", (● : domaine TIR, $\rightarrow$: activation, $\rightarrow$: inhibition).

Deux voies d'activation de la signalisation TLR ont principalement été étudiées : la voie dépendante de MyD88 et la voie dépendante de TRIF. Le recrutement des adaptateurs conduit à l'activation de kinases qui phosphorylent en dernier lieu les protéines activées par un mitogène (MAPK), les inhibiteurs de NF- κ B ou les protéines régulatrices IRF (qui contrôlent la synthèse d'IFN de type I) afin de contrôler l'expression de gènes pro-inflammatoires. TIRAP est le relais de la voie MyD88-dépendante suite à l'activation des TLR2 et TLR4 (Yamamoto *et al.*, 2002). TRAM participe sélectivement à l'activation de la voie TRIF-dépendante suite à l'activation de TLR4. Une étude a mis en évidence la dissociation des voies MyD88 et TRIF dans la signalisation par TLR4 (Mata-Haro *et al.*, 2007). En effet, le "monophosphoryl lipid A" ou MPL, dérivé du LPS active la voie dépendante de TRIF mais pas la voie dépendante de MyD88. SARM, contrairement aux autres adaptateurs est un régulateur négatif de la voie NF- κ B et de l'activation des IRF de la voie TRIF-dépendante.

L'adaptateur MyD88 est utilisé par tous les TLR, à l'exception de TLR3 qui utilise TRIF. MyD88 interagit avec un complexe formé d'IRAKs (IL-1R-Associated Kinase) et de TRAF6 (TNF-Receptor-Associated Factor 6). La protéine I κ B α (Inhibitor of NF- κ B α) séquestre le facteur transcriptionnel NF- κ B dans le cytoplasme. La cascade enclenchée conduit à la phosphorylation d'I κ B α , sa polyubiquitination et sa dégradation par le protéasome. Ainsi, NF- κ B est libéré et peut transloquer dans le noyau où il induit l'expression de gènes pro-inflammatoires. TRAF6 régule également la voie des MAPK qui aboutit à l'activation du complexe de transcription AP-1 (Jun/Fos) qui agit seul ou en

synergie avec NF- κ B sur les promoteurs de gènes cibles. Finalement, TRAF6 module l'activité des régulateurs transcriptionnels IRF qui agissent seul ou en combinaison avec NF- κ B. Ainsi, les facteurs IRF3 ou IRF7 induisent la production d'IFN de type I alors qu'IRF5 active celle de médiateurs pro-inflammatoires. (Figure 5A). La signalisation TLR active la voie classique du facteur transcriptionnel NF- κ B, qui est alors formé des sous-unités pro-inflammatoires p65 et p50.

Les domaines N- et C-terminaux de l'adaptateur TRIF recrutent différentes molécules de signalisation. TRIF dispose dans son extrémité N-terminal d'un motif de fixation à TRAF6 et TRAF3. Du côté C-terminal, TRIF est doté d'un motif d'interaction homotypique RIP (Receptor-interacting protein) par lequel il interagit avec RIP1 (Kawai et Akira, 2010). TRAF6 et RIP1 activent NF- κ B alors que TRAF3 est responsable de la phosphorylation d'IRF3. La forme phosphorylée d'IRF3 migre dans le noyau et active l'expression de gènes codant les IFN de type I (Figure 5). La signalisation TLR active aussi la transcription de gènes codant des régulateurs impliqués dans le contrôle positif de la réponse comme Jun, Fos ou I κ B ζ . Par exemple, I κ B ζ joue un rôle synergique avec NF- κ B dans l'activation de la transcription des gènes codant l'IL-6 ou l'IL-12p40 (Yamamoto *et al.*, 2004).

3- Une régulation négative induite par l'activation des TLR

La transcription et la traduction des gènes pro-inflammatoires est sous une régulation stringente. Leur expression rapide, de très grande amplitude est néanmoins transitoire. En effet, relâchées en excès ou de façon incontrôlée, certains médiateurs de la réponse pro-inflammatoire peuvent provoquer de sérieux dommages tissulaires. Certains des gènes surexprimés suite à la signalisation TLR sont donc associés à la régulation négative de la réponse permettant un retour des plus rapides à l'homéostasie. Ces régulateurs négatifs inhibent différentes étapes de la cascade de signalisation (Figure 5). Parmi ces molécules, on trouve des compétiteurs de protéines adaptatrices (SIGIRR, MyD88s ou SARM), des enzymes de modification (A20/TNFAIP3 ou SHP-1), des facteurs de transcriptions (ATF3) ou des molécules affectant la stabilité des ARNm des gènes pro-inflammatoires tel les microARN (miR-155) ou des nucléases/activateur de nucléases (ZFP36, ZC3H12, ...). Une perte de ces régulateurs négatifs empêche le retour à l'homéostasie et cause des désordres inflammatoires dans des modèles murins. En effet, les souris déficientes pour A20, régulateur négatif de la voie NF- κ B, développent une inflammation chronique dans de nombreux organes qui conduit à la mort prématurée de l'animal à 5-6 semaines (Turer *et al.*, 2008). La signalisation TLR est soumise à un phénomène de tolérance empêchant l'initiation d'une réponse lors d'une exposition répétée à un MAMP. Les régulateurs négatifs tels que IRAK-M dans le phénomène de tolérance au LPS jouent un rôle important (de Vos *et al.*, 2009).

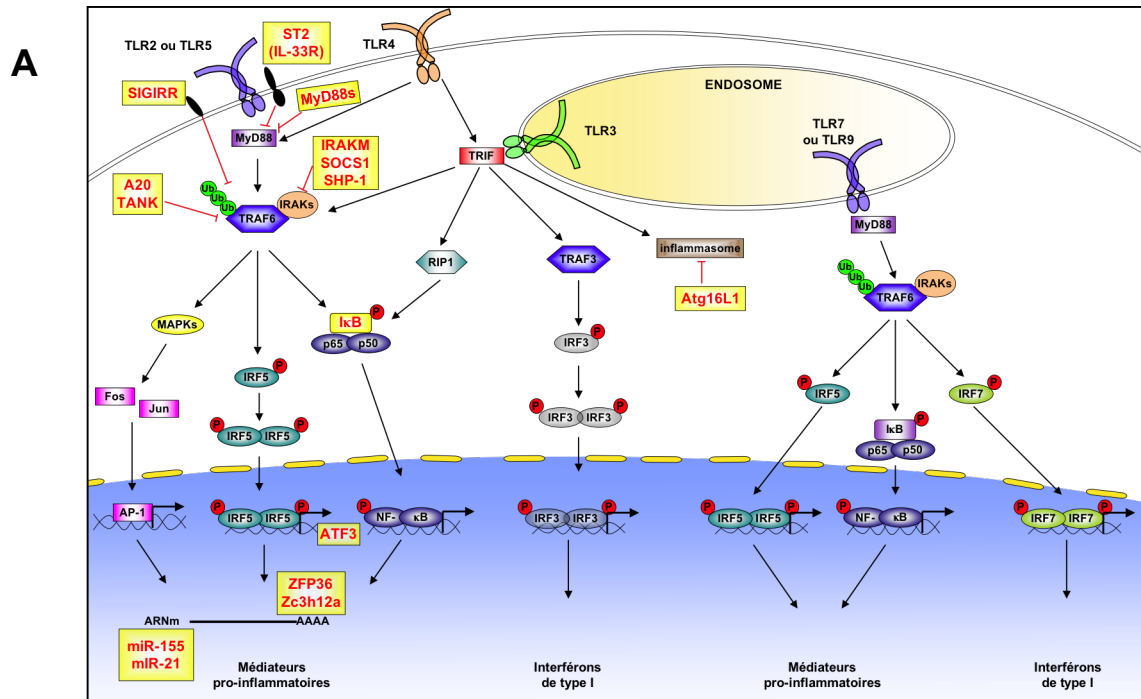


Figure 5: Les principaux régulateurs négatifs de la signalisation TLR

(A) Représentation schématique de la cascade de régulation et des différents régulateurs négatifs inhibant la réponse TLR. Les réponses TLR sont contrôlées principalement par les adaptateurs MyD88 et TRIF. Lors de l'activation des TLR2, TLR4 et TLR5, MyD88 recrute un complexe formé d'IRAKs et de TRAF6 et induit des réponses inflammatoires en activant les voies MAPK, NF-κB (p50/p65) et IRF5. L'activation des TLR3 et TLR4 recrute TRIF qui interagit avec TRAF3, RIP1 et un complexe formé d'IRAKs et de TRAF6. RIP1 et TRAF6 active en coordination les voies MAPK et NF-κB, TRAF3 induit la phosphorylation de IRF3 qui contrôle l'expression des interférons de type I. La stimulation des TLR7 et TLR9 recrute MyD88 qui interagit avec un complexe formé d'IRAKs et de TRAF6. TRAF6 active les voies IRF5 et NF-κB pour l'induction des médiateurs pro-inflammatoires ainsi que IRF7 pour l'induction des interférons de type I. Les régulateurs négatifs ciblent principalement les étapes suivantes : l'initiation de la cascade de signalisation via les adaptateurs (MyD88), l'activation du complexe IRAKs-TRAF6 et la transcription ou les transcrits des gènes pro-inflammatoires. *Adapté de Kawai et al, Nature Reviews Immunology 2010* (B) Nature et activité des principaux régulateurs négatifs de la signalisation TLR. La déficience en ces régulateurs entraîne généralement des inflammations chroniques et sévères dues à une activation prolongée de la réponse TLR. (P : Phosphorylation, → : activation, + : inhibition)

4- Coopération

Des études ont mis en évidence que certains TLR pouvaient agir en synergie. En effet, la stimulation de cellules dendritiques avec une combinaison d'agonistes TLR élève le niveau d'expression des gènes ainsi que la sécrétion de certaines cytokines par rapport à l'effet obtenu avec un agoniste seul (Napolitani *et al.*, 2005). La production d'IL-12p70 (composé des chaînes IL-12p40 et IL-12p35) est caractéristique d'un effet synergique de certains TLRs. Cette cytokine est peu exprimée après une stimulation simple via TLR4 ou TLR7, mais son expression est amplifiée près de 100 fois après une activation simultanée des TLR4 et TLR7 (Gautier *et al.*, 2005). L'activation de plusieurs TLR de façon simultanée peut également modifier la nature et la qualité de la réponse due à une seule stimulation avec par exemple le changement d'orientation de la réponse T effectrice initiale. Il a également été observé que l'expression du gène codant l'IL-10 peut être diminué par une stimulation combinée de plusieurs TLR (Re et Strominger, 2004). Les 5 adaptateurs moléculaires des domaines TIR des TLR et la composition des complexes de signalisation pourraient contribuer à ces effets. La coopération entre plusieurs TLR, d'une part, et TLR et autres PRR, d'autre part, n'est pas une exception dans la réponse anti-infectieuse puisque chaque pathogène exprime simultanément plusieurs agonistes (Figure 1). L'intensité et la qualité des réponses immunitaires est donc dépendante de la distribution dans l'organisme des divers PRR et de leur coordination (Figure 3B).

D- Pathologies associés aux TLR

Les souris déficientes en TLR ont contribué à définir leur rôle dans le contexte infectieux. Ces modèles ont montré un rôle clé des TLR dans les défenses anti-microbiennes innées et adaptatives. Ainsi, la lignée de souris C3H/HeJ, mutée dans *Tlr4*, est très sensible aux infections par des bactéries à gram négatif comme *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium (*S. typhimurium* dans la suite de ce mémoire) (O'Brien et Rosenstreich, 1983) et *Neisseria meningitidis* (Woods *et al.*, 1988). Les souris déficientes en TLR5 ou TLR11 sont, quant à elles, susceptibles aux infections urinaires à *Escherichia coli* (Andersen-Nissen *et al.*, 2007a; Zhang *et al.*, 2004). Les souris déficientes en TLR3 ont été décrites plus résistantes aux infections par le virus "West-Nile" (Wang *et al.*, 2004). Dans ce dernier cas, la signalisation TLR3 précipite la réaction pro-inflammatoire et aboutit à une réponse immunitaire incontrôlée néfaste pour la survie de l'animal. Le rôle des TLR a également été étendu à des pathologies inflammatoires dépendantes des microorganismes commensaux. Une étude a ainsi décrit que la délétion du gène *Tlr5* provoque l'apparition spontanée de colites (Vijay-Kumar *et al.*, 2007). Ainsi, les souris déficientes développent une réaction inflammatoire exacerbée contre la flore commensale. Cependant, ces travaux n'ont pas été reproduits à ce jour par d'autres équipes de recherche (Vijay-Kumar *et al.*, 2007). L'utilisation des agonistes de TLR ou le ciblage d'un élément de la cascade de signalisation permettrait

donc de développer de nouvelles thérapies contre les maladies infectieuses ou inflammatoires.

Chez l'Homme, des polymorphismes dans les gènes codants les TLR ou les adaptateurs de la signalisation sont associés à une susceptibilité à certaines maladies ou infections (Tableau 2). Par exemple, les individus porteurs du polymorphisme Arg753Gln sur TLR2 montrent une sensibilité accrue à la tuberculose (Pandey et Agrawal, 2006) ainsi qu'une réponse diminuée face aux Staphylocoques (Lorenz *et al.*, 2000). Les individus déficients pour l'adaptateur MyD88 sont plus sensibles aux infections pyogéniques comme les infections invasives aux pneumocoques (von Bernuth *et al.*, 2008). L'analyse du polymorphisme de TLR5 chez l'homme a mis en évidence une mutation d'un codon sens en codon Stop donnant naissance à un récepteur TLR5 tronqué de 392 résidus (Hawn *et al.*, 2003). Cette molécule incapable d'activer NF- κ B fonctionne comme un dominant négatif. En effet, des monocytes d'individus hétérozygotes *TLR5/TLR5*^{392STOP} ne répondent pas à la flagelline. Les individus possédant cette mutation sont sensibles aux infections respiratoires par *Legionella pneumophila* et ont une diminution significative d'IgG et d'IgA contre la flagelline, alors que leur taux d'anticorps anti-LPS est comparable à celui individus normaux.

Dans certains cas, des polymorphismes sont protecteurs et ont vraisemblablement un avantage sélectif au cours de l'évolution. En effet, une étude a mis en évidence que le polymorphisme Ser180Leu dans l'adaptateur MAL (ou TIRAP) est associé à une protection contre la malaria, la tuberculose ou les bactériémies à pneumocoques (Khor *et al.*, 2007).

TLR	Polymorphism	Disease link
TLR4	Asp299Gly/ Thr399Ile	Individuals are hyporesponsive to LPS Predisposition to severe malaria among African children
TLR2	Arg753Gln	Increased susceptibility to tuberculosis Reduced responses to Gram-positive bacteria
	Arg677Trp	Increased risk of lepromatous leprosy in a Korean population
TLR5	392STOP	Increased susceptibility to Legionnaire's disease
IRAK4	Deficiency	Increased susceptibility to pyogenic bacteria Show resistance to viral, fungal and parasitic infections
NEMO	C417R	Causes the condition XR-EDA-ID Increased susceptibility to pyogenic infections
IKB-A	S32I	Causes the condition AD-EDA-ID Increased susceptibility to pyogenic infections
MAL	S180L	Protective against malaria, tuberculosis, bacteraemia and pneumococcal bacteraemia
	C558T	Increased susceptibility to tuberculosis

Tableau 2 : Polymorphismes génétiques de la signalisation TLR associées à des infections chez l'Homme.

Les polymorphismes dans la séquence des gènes des TLR ou des molécules de la cascade de signalisation ont été associés soit à une susceptibilité soit à une protection aux infections. D'après Carpenter *et al*, *Cellular Microbiology* 2007.

II- Les TLR dans l'immunité anti-infectieuse des muqueuses

L'immunité anti-infectieuse peut être définie comme l'ensemble des mécanismes biologiques permettant à un organisme de préserver son intégrité tout en éliminant les agents pathogènes ou en atténuant les effets délétères du pathogène comme l'inflammation aiguë ou chronique ou la destruction tissulaire par des toxines. Les sites muqueux des mammifères sont exposés en permanence à une quantité importante d'agents environnementaux. Durant la respiration chez l'homme, plusieurs milliers de litres d'air chargés en particules et aérosols transitent quotidiennement dans les voies aériennes. L'alimentation et la boisson que nous ingérons contiennent également des contaminants divers. Les muqueuses du tractus gastro-intestinal, respiratoire et urogénital sont donc la porte d'entrée de la majorité des agents infectieux et représentent à ce titre des sites importants de l'immunité anti-infectieuse. Par exemple, les agents de la tuberculose, des pneumonies, des grippes et des méningites ciblent la muqueuse respiratoire, le virus du SIDA les muqueuses génitales et les agents de toxi-infections ou de la poliomyélite la muqueuse intestinale. Toutes ces infections ont un impact majeur en Santé Publique à travers le monde ; elles touchent principalement les pays sous-développés et en développement, mais représentent également une menace pour les pays riches (Mizgerd, 2006). Comprendre les mécanismes anti-infectieux au sein des muqueuses et les exploiter à des fins thérapeutiques et prophylactiques est donc un besoin réel en Santé Publique. Dans ce chapitre, nous exposerons certaines caractéristiques de l'immunité dans les muqueuses intestinales et pulmonaires à l'homéostasie et en réponse à la signalisation TLR.

A- Organisation et compartimentation des muqueuses

Les muqueuses sont des surfaces physiologiquement actives qui tapissent les cavités en contact avec l'environnement extérieur (pathogènes, allergènes,...). On retrouve ainsi les muqueuses respiratoires, digestives, urinaires ou génitales. Ces muqueuses représentent la première ligne de défense contre les pathogènes. Elles sont organisées de façon similaire, même si certains organes muqueux possèdent des stratégies de défenses spécifiques, dû à leur fonction biologique, comme l'estomac qui utilise de l'acide rendant ainsi sa lumière hostile au développement microbien. Les muqueuses possèdent leur propre système immunitaire et présentent la particularité d'être compartimentées (Figure 6). Elles se composent de trois parties : le compartiment externe, i.e. la lumière, la barrière épithéliale et le compartiment interne, i.e. la *lamina propria*.

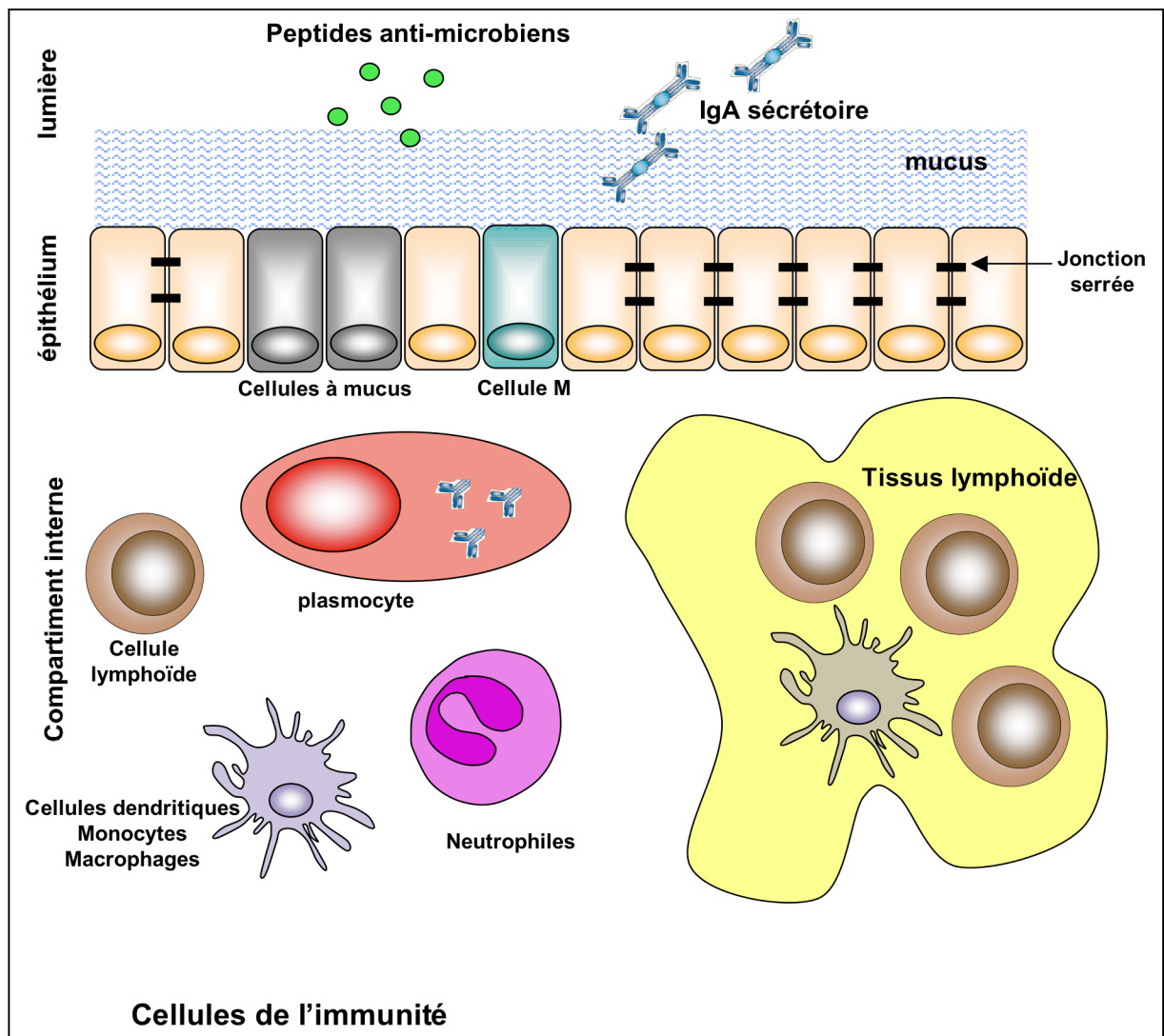


Figure 6: Représentation schématique des défenses muqueuses.

Les muqueuses sont compartimentées par la barrière de cellules épithéliales. La lumière, site en contact avec l'environnement extérieur, contient divers facteurs permettant l'exclusion et l'élimination des agents infectieux. Ainsi, l'épithélium est protégé par le mucus (empêchant la diffusion de macromolécules et le déplacement de particules), les peptides antimicrobiens (défensines α et β , RegIII β et γ , ou lysozyme), et les anticorps sécrétoires (IgA) qui excluent et opsonisent les agents infectieux de la barrière épithéliale. Les cellules épithéliales représentent une variété importante de cellules parmi lesquelles des cellules assurant les fonctions physiologiques de la muqueuse (échange environnement-compartiment interne d'eau, de gaz, de toxiques, ...), des cellules productrices de mucus (cellules de "goblet" ou cellules caliciformes), les cellules productrices de défensines (cellules de "paneth" dans l'intestin), des cellules spécialisées dans le transport actif d'antigènes et de particules (cellules M), des cellules endocrines, ou des cellules nerveuses. Les cellules de l'immunité sont localisées dans le compartiment interne et peuvent s'organiser en tissus lymphoïdes organisés (MALT pour "Mucosa-associated lymphoid tissue") tels les plaques de Peyer, les follicules lymphoïdes ou les ganglions. Les MALT sont les sites d'induction des réponses spécifiques d'antigènes microbiens dans lesquels les cellules présentatrices d'antigènes ayant capturées et apprêtées les antigènes microbiens les présentent aux lymphocytes B et T. Une fois activés, les lymphocytes peuvent être adressés spécifiquement aux muqueuses via des intégrines et des récepteurs aux chimiokines spécifiques.

Le compartiment externe est à l'origine des apports environnementaux en nutriments, eau et air. Du mucus est libéré dans cet espace de manière à humidifier et protéger les cellules de la barrière épithéliale. La lumière contient également des peptides anti-microbiens tels les défensines (voir p21) ou des anticorps sécrétés, notamment les IgA, par les plasmocytes peuplant les muqueuses (Strugnell, 2010). Le compartiment externe de nombreuses muqueuses héberge une flore microbienne dite commensale qui constitue alors un élément essentiel de la maturation et de la régulation de l'immunité muqueuse (Hooper et Macpherson, 2010). En revanche, ce compartiment est dépourvu de microorganismes dans les muqueuses telle la muqueuse pulmonaire. À l'homéostasie, le compartiment externe est généralement pauvre en cellules immunitaires. Cependant, les voies respiratoires hébergent constitutivement des macrophages dans la lumière des alvéoles pulmonaires qui peuvent immédiatement phagocyter des particules ou des microorganismes en cas d'infections (Holt *et al.*, 2008).

L'épithélium fait barrage à l'intrusion des pathogènes dans le compartiment interne où résident des cellules de l'immunité. En effet, la surface des muqueuses est constituée principalement de cellules épithéliales sous forme mono- (intestin et poumon) ou pluri-stratifiées (œsophage, trachée ou bronches) qui forment une barrière complexe imperméable à la plupart des agents infectieux. Ainsi, les cellules épithéliales sont les premières cellules à faire face aux microorganismes. Elles sont polarisées, assurant ainsi les fonctions physiologiques d'échange entre la zone externe apicale et la zone interne basale (comme les échanges gazeux ou l'absorption de nutriments). La fonction de barrière est rendue possible grâce à l'élaboration de jonctions serrées entre les cellules épithéliales adjacentes. Le renouvellement de ces épithéliums permet d'éliminer les cellules épithéliales sénescents et représente un mécanisme participant à la protection contre l'infection par des agents pathogènes. Les mouvements animant les surfaces épithéliales tels que les cils des cellules épithéliales bronchiques ou le péristaltisme des tissus intestinaux participent aussi à l'effet de barrière. L'épithélium intestinal et pulmonaire est en fait constitué de nombreux types de cellules épithéliales incluant des cellules productrices de mucus ou de molécules anti-microbiennes, de cellules endocrines, cellules M, de cellules ciliées, etc... De plus, des cellules immunitaires peuvent être intégrées à l'épithélium comme les cellules dendritiques ou les lymphocytes intra-épithéliaux. Des travaux pionniers de Kagnoff et Eckmann ont mis en évidence le rôle primordial des cellules épithéliales dans l'immunité innée anti-infectieuse puis dans l'immunité innée dépendante des TLR. (Janot *et al.*, 2009; Kagnoff et Eckmann, 1997).

Finalement, le compartiment interne est constitué de cellules immunitaires myéloïdes et lymphoïdes mais également de diverses cellules structurales. Les cellules immunitaires entretiennent un dialogue constant avec les cellules épithéliales que nous détaillerons dans la suite de ce chapitre en particulier lors d'un stress infectieux. Selon le niveau d'infection

dans l'axe lumière-*lamina propria*, différents effecteurs moléculaires et cellulaires vont intervenir dans la réponse immunitaire innée et adaptative. Ces effecteurs sont également compartimentés dans la lumière, l'épithélium et/ou la *lamina propria*. De plus, ils présentent des caractéristiques uniquement retrouvées au sein des muqueuses.

B- Mécanismes moléculaires et cellulaires de l'immunité innée muqueuse

Les mécanismes de défense innée mis en place pour combattre les infections microbiennes sont (1) constitutifs permettant une protection permanente, et (2) inductibles par la détection des signaux de danger microbien. La défense constitutive repose principalement sur (1) une défense mécanique grâce à la barrière épithéliale, (2) une défense biochimique grâce à la sécrétion de molécules anti-microbiennes, et (3) une défense phagocytaire grâce aux macrophages résidents (en particulier dans le système respiratoire). À l'homéostasie, les cellules épithéliales participent pleinement à la défense mécanique et biochimique. Ces mêmes cellules par leur positionnement ont été sélectionnées comme cellules sentinelles et peuvent ainsi détecter toute agression des surfaces muqueuses par des microorganismes via divers PRR et en particulier les récepteurs TLR. De plus, les cellules épithéliales isolées de diverses muqueuses expriment de nombreux TLR (Abreu, 2010; Gribar *et al.*, 2008). Dans ce mode inductible, les cellules épithéliales contribuent à la défense mécanique, biochimique et phagocytaire (Figure 7) (Evans *et al.*, 2010; Hooper et Macpherson, 2010).

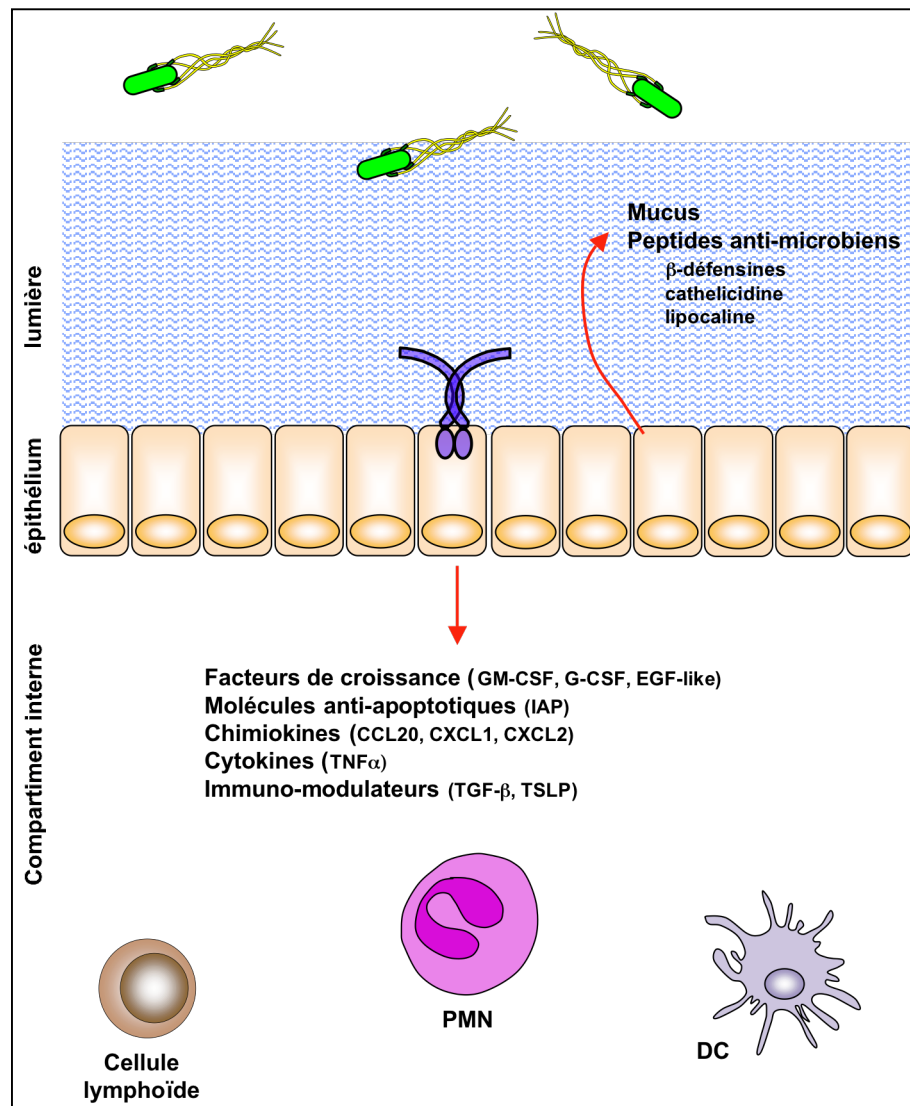


Figure 7: L'immunité innée muqueuse dépendante des TLR.

Au niveau des muqueuses, l'épithélium sécrète constitutivement du mucus et des molécules anti-microbiennes dans la lumière et des immuno-modulateurs dans le compartiment interne, formant une défense de base pour la muqueuse. Lors d'une infection, les TLR présents à la surface des cellules épithéliales détectent les pathogènes et induisent la production de médiateurs de l'immunité innée. La réponse TLR augmente les défenses constitutives (mucus, molécules anti-microbiennes), induit la sécrétion de cytokines pour la réponse inflammatoire, de chimiokines pour le recrutement des cellules de l'immunité ou de facteurs de croissance et molécules anti-apoptotiques pour protéger et réparer la barrière épithéliale. L'ensemble de ces réponses constitue l'immunité innée muqueuse.

1- Les molécules anti-microbiennes de la défense innée

L'épithélium répond aux pathogènes en produisant de nombreux médiateurs actifs directement contre les pathogènes (Janot *et al.*, 2009; Kagnoff et Eckmann, 1997). Ces molécules anti-microbiennes inhibent le métabolisme des microorganismes ou les tuent. Les peptides antimicrobiens ou défensines constituent une famille importante. Ces peptides de 12 à 50 acides aminés contiennent 50% de résidus hydrophobes et de nombreux résidus de charge positive qui vont interagir préférentiellement avec les parois des microorganismes (Zasloff, 2002). Deux mécanismes d'action principaux des défensines ont été proposés : la formation de canaux ioniques et la rupture de la membrane microbienne qui vont contribuer à la mort des microorganismes (Brown et Hancock, 2006). Les défensines exercent leurs propriétés anti-microbiennes sur les bactéries à Gram positif et négatif mais aussi sur les champignons ou les virus enveloppés (Kaiser et Diamond, 2000). Certaines de ces molécules sont produites de façon constitutive comme les α -défensines dans l'intestin ou de façon inductible après activation par les TLR, comme la défensine HBD-2 (Ogushi *et al.*, 2004) (Froy, 2005). L'analyse du promoteur du gène *HBD2* a révélé la présence de sites de fixation pour NF- κ B à l'origine de la réponse stimulée par les agonistes de TLR et les pathogènes (Ogushi *et al.*, 2004). En plus de leur activité anti-microbienne, certaines défensines possèdent des propriétés chimio-attractantes pour les monocytes et les cellules dendritiques (Territo *et al.*, 1989; Yang *et al.*, 1999).

Les muqueuses et plus particulièrement leurs cellules épithéliales peuvent aussi produire d'autres composés aux propriétés anti-microbiennes tels que les lipocalines, les calgranulines S100A, les lectines RegIII β et RegIII γ , des opsonines, des collectines ou des enzymes comme le lysozyme (Chan *et al.*, 2009; Jeffery, 1987; Kolls *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2008a). Cependant, la contribution épithéliale des TLR dans la synthèse de ces composés n'a pas été montrée. Plus récemment, les cytokines IL-17 et IL-22 ont été identifiées comme activateur majeur de ces composés microbiens (Voir chapitre III et Tableau 3). Le mode d'action de ces molécules anti-microbiennes est varié : séquestration du fer ou de sidérophore (lipocaline), lyse microbienne (RegIII) ou opsonisation (collectines).

2- Le recrutement et l'activation des neutrophiles

Les étapes initiales d'une infection microbienne sont caractérisées par la production de cytokines et chimiokines, absentes à l'homéostasie, en réponse à une stimulation TLR. Les chimiokines déclenchent la migration des phagocytes du sang vers la muqueuse et les cytokines participent à l'activité microbicide des phagocytes et au déclenchement d'une réaction inflammatoire. L'épithélium est la source majeure de ces cytokines et chimiokines. Par exemple, des cellules épithéliales bronchiques et alvéolaires exposées à *Haemophilus influenzae* ou *Pseudomonas aeruginosa* ou à différents composés microbiens (agonistes

TLR) produisent de l'IL-8 (CXCL8), du TNF- α et de l'IL-6 (Didierlaurent *et al.*, 2008; Feuillet *et al.*, 2006; Janot *et al.*, 2009; Khair *et al.*, 1996; Mayer *et al.*, 2007; Raoust *et al.*, 2009).

Les neutrophiles migrent rapidement au site d'infection et sont ainsi les premières cellules immunitaires à intervenir. Ces cellules sont définies par l'expression des marqueurs de surface suivants : Ly6C et Ly6G (dénommé également Gr1) et CD11b. Les neutrophiles expriment également les récepteurs aux chimiokines CXCR1 et/ou CXCR2, nécessaires à leur recrutement. La chimiokine CXCL8 permet le recrutement de neutrophiles chez l'Homme. Les chimiokines comme CXCL1 (KC), CXCL2 (MIP-2 α) et CXCL5 (ENA-78) participent également à la mobilisation des neutrophiles, plus particulièrement chez la souris qui ne possède pas d'homologue de CXCL8 (Craig *et al.*, 2009). Les chimiokines CXCL sont également responsables de l'activation des neutrophiles. D'autres médiateurs peuvent influencer l'activation des PMN tel le TNF α ou l'IL-1 β . Ainsi, une infection respiratoire à *P. aeruginosa* induit l'accumulation de neutrophiles au niveau du tractus respiratoire dans un mécanisme dépendant de CXCR2 et de la chimiokine CXCL2. Des observations similaires pour le couple CXCR1 et CXCL2 ont été réalisées sur la muqueuse urogénitale en réponse à des bactéries pathogènes (Godaly *et al.*, 2000). Les neutrophiles ont une durée de vie de quelques heures dans la circulation sanguine. Leur mobilisation dans les tissus est généralement associée à une augmentation de leur demi-vie par des facteurs de croissance tel le G-CSF ou le GM-CSF (Craig *et al.*, 2009).

Les neutrophiles jouent un rôle primordial dans les défenses de l'organisme contre les infections. Leur principale fonction est l'élimination des agents pathogènes extracellulaires par phagocytose couplée à des activités microbicides ou par la dégranulation de composés toxiques dans leur environnement. Ils ont en effet la capacité de produire (1) des dérivés oxygénés par l'action de la myéloperoxydase et de la NADPH oxydase et (2) de nombreuses protéases. Les neutrophiles peuvent aussi produire des pièges extracellulaires, les « neutrophil extracellular trap » (NET). Ce système va permettre d'immobiliser les microorganismes et de les détruire (Brinkmann *et al.*, 2004). Par leurs récepteurs au complément (CR1 ou CD35 et CR3 ou CD11b/CD18) et leurs récepteurs aux immunoglobulines (Fc γ R : CD32 et CD64), les neutrophiles sont capables de phagocyter les particules et microorganismes opsonisés.

Les macrophages tissulaires sont localisés dans différents compartiments des muqueuses et participent au maintien de l'homéostasie cellulaire par la clairance des cellules apoptotiques. Dans le poumon, les macrophages se situent dans la lumière des alvéoles et le parenchyme, tandis que dans le tractus intestinal ils sont uniquement présents dans la partie basale de la barrière épithéliale. Les macrophages alvéolaires représentent plus de 90% des cellules isolées du lavage pulmonaire chez un individu sain. À l'homéostasie, les macrophages sont anti-inflammatoires ou de type M2 : ils phagocytent et séquestrent les antigènes mais suppriment le développement de réponse adaptative inflammatoire. Leur

activité anti-inflammatoire s'applique sur les DC et les cellules T en régulant leur migration (Holt *et al.*, 1993; Jakubzick *et al.*, 2006). À l'homéostasie, le renouvellement des macrophages est réalisé par les monocytes résidents (voir paragraphe "les cellules présentatrices des muqueuses"). En revanche, en condition inflammatoire un renouvellement rapide est assuré par les monocytes inflammatoires attirés dans le tissu selon l'axe CCL2-CCR2 (Winter *et al.*, 2007). Ces macrophages de type M1 ont un phénotype activé ou inflammatoire qui favorise la clairance des pathogènes ainsi que la stimulation des réponses adaptatives (Holt *et al.*, 2008). Dans le contexte infectieux, l'activation des macrophages par les agonistes TLR augmente leur capacité de phagocytose et leurs fonctions microbicide (dérivés actifs de l'oxygène et de l'azote) (Gwinn et Vallyathan, 2006). Ainsi, les macrophages M1 sont activés par le LPS, le GM-CSF et l'IFN γ et produisent en réponse des cytokines pro-inflammatoires (IL-12, IL-23 et IL-10) ainsi que des molécules microbicides. Ces macrophages M1 éliminent activement les pathogènes et orientent la réponse T vers un profil Th1 (Gordon et Taylor, 2005).

D'un point de vue phénotypique, les macrophages sont définis par les marqueurs CD11b et F4/80. Selon les tissus, d'autres marqueurs peuvent être utilisés. Par exemple, les macrophages alvéolaires sont F4/80⁺CD11c⁺MHCII⁺.

3- Réparation de l'épithélium et intégrité de la défense mécanique

L'infiltration des cellules immunitaires au sein des muqueuses, les facteurs de virulences des bactéries et les molécules de défenses sont à même d'altérer les propriétés mécaniques de barrière des surfaces épithéliales. Les dommages peuvent atteindre les cellules épithéliales elles-mêmes provoquant une rupture de la perméabilité ou la production de mucus exacerbant l'interaction des microorganismes avec les surfaces muqueuses. L'épithélium activé par les microorganismes est capable de produire des facteurs anti-apoptotiques, des molécules de réparation et de différenciation tissulaire afin de préserver les fonctions de barrière (Abreu, 2010; Pasparakis, 2009). Dans la muqueuse intestinale, il a été démontré que la signalisation NF- κ B, les récepteurs TLR et l'adaptateur MyD88 au sein des cellules épithéliales sont indispensables pour maintenir l'homéostasie et les propriétés de barrière (Nenci *et al.*, 2007; Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004). En leur absence, les cellules épithéliales rentrent en apoptose à une fréquence élevée, la différenciation de leurs cellules souches est réduite et la synthèse de facteurs de croissance comme l'amphiréguline ou l'épiréguline est altérée. Les animaux déficients dans la signalisation TLR épithéliale se révèlent donc plus sensibles aux infections par divers pathogènes intestinaux et à la tolérance de la flore microbienne. La contribution de la réparation et de la prolifération épithéliale au sein du tissu pulmonaire est peu caractérisée. Cependant, des différences importantes de demi-vie existent entre l'épithélium de l'intestin (5 jours environ) et

l'épithélium broncho-alvéolaire (plusieurs mois), suggérant des mécanismes de réparation distincts.

C- Réponse adaptative des muqueuses aux pathogènes

L'immunité innée inductible possède comme autre fonction essentielle l'activation du système adaptatif. La réponse adaptative est un système de défense basé sur la reconnaissance d'antigènes (motifs moléculaires microbiens très variables) par des lymphocytes T et B. Elle permet d'installer une mémoire immunitaire spécifique du pathogène rencontré. Ainsi, en cas de seconde exposition au même micro-organisme, les effecteurs préformés de la réponse adaptative anti-pathogène (lymphocytes et anticorps) permettent une clairance rapide, efficace et totalement spécifique contrairement à l'immunité innée. Les signaux microbiens intégrés par l'immunité innée fournissent une signature de la nature du pathogène rencontré (Figure 3B): le couplage de l'immunité innée à l'immunité adaptative permet ainsi de programmer la réponse la plus appropriée au contrôle de l'infection. L'activation de la réponse adaptative peut se diviser en six grandes phases : (1) la capture de l'agent pathogène par des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (2) l'activation des CPA, (3) la migration des CPA vers les tissus lymphoïdes, (4) l'apprêtement de l'antigène, (5) l'activation de lymphocytes spécifiques des antigènes du pathogène dans les tissus lymphoïdes et (6) la migration des effecteurs lymphocytaires au site d'infection (Figure 8). Le premier modèle privilégié pour réaliser l'interaction pathogène et CPA est celui dans lequel la CPA est intra-épithéliale et ainsi capable d'émettre des protrusions dans le compartiment apical (Niess *et al.*, 2005; Rescigno *et al.*, 2001; Vallon-Eberhard *et al.*, 2006). L'activation trans-épithéliale des CPA par les pathogènes peut être contrôlée par la signalisation TLR (Chieppa *et al.*, 2006). Le deuxième modèle repose sur la rencontre du pathogène par la CPA dans la *lamina propria* après passage à travers l'épithélium. Ce processus peut fonctionner (1) dans les sites spécialisés comme les plaques de Peyer de l'intestin où les cellules M transportent les particules du compartiment apical vers le basal ou (2) lors de rupture de la barrière épithéliale par des mécanismes de virulence microbienne ou des phénomènes immuno-pathologiques. À nouveau, la contribution des TLR a été avancée pour expliquer la stimulation muqueuse de la réponse adaptative (Chabot *et al.*, 2006; Niedergang *et al.*, 2004).

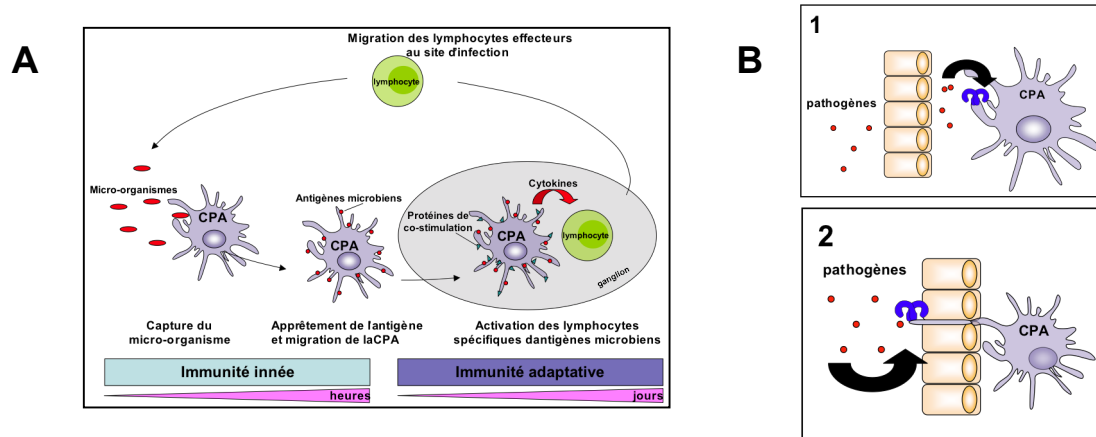


Figure 8 : Modèle d'activation de la réponse immunitaire adaptative anti-infectieuse.

(A) Activation de la réponse adaptative. La mise en place de l'immunité adaptative nécessite la participation de cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Après capture du microorganisme pathogène, les CPA migrent jusqu'au tissu lymphoïde drainant le site d'infection. Cette étape dépend de la composante innée de l'immunité. En effet, les CPA sont activées par des récepteurs de l'immunité innée détectant les motifs microbiens pour acquérir les capacités de migration, de présentation antigénique, et de stimulation des lymphocytes naïfs. Les CPA dans le tissu infecté sont des cellules résidentes telles que les cellules dendritiques et les macrophages ou des cellules recrutées tels que les monocytes. Au sein du tissu lymphoïde, les CPA activées (matures sur le plan fonctionnel) stimulent la prolifération et la différenciation des lymphocytes naïfs en lymphocytes effecteurs. Ce processus permet ainsi d'initier une réponse adaptative spécifique de divers antigènes du pathogène rencontré. Les lymphocytes T activés migrent alors au site d'infection pour participer à l'élimination du microorganisme. Ces lymphocytes T contribuent également à la réponse en anticorps par leur activité auxiliaire sur la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes.

(B) Activation des cellules présentatrices d'antigènes des muqueuses. Au site muqueux, deux modèles d'activation des CPA via les TLR sont proposés. (1) Le pathogène traverse la barrière épithéliale et active les TLR présents à la surface des CPA ou (2) les TLR des CPA trans-épithéliales sont activés par les pathogènes présents dans la lumière. Il faut noter que les CPA des muqueuses présentent les antigènes dans les ganglions associés à l'épithélium (comme les plaques de Peyer dans l'intestin) ou les ganglions drainant le tissu muqueux tels que les ganglions mésentériques pour l'intestin ou médiastinaux pour le poumon. Ces tissus lymphoïdes sont dénommés MALT pour "Mucosa-associated lymphoid Tissue".

1- Les cellules présentatrices d'antigènes des muqueuses

Deux populations sont des CPA majeures dans les muqueuses : les cellules dendritiques ou DC et les monocytes. Les DC représentent les CPA les plus efficaces pour initier à partir de lymphocytes naïfs une réponse immunitaire contre un nouvel antigène. Les DC résidentes ou arrivant au site d'infection via les récepteurs CCR2 et CCR6 sont dites immatures, elles présentent une grande capacité de capture de pathogènes et d'antigènes mais une faible capacité d'activation des cellules T (Osterholzer *et al.*, 2005; Vanbervliet *et al.*, 2002). Après l'activation par des PRR spécifiques du pathogène, les DC vont subir un processus de maturation pendant lequel elles vont perdre leurs fonctions de phagocytose mais acquérir les nouvelles fonctions d'activation et de polarisation des cellules T. De façon remarquable, les DC expriment de nombreux TLR (voir chapitre I). Les DC conventionnelles qui sont les CPA de l'immunité anti-infectieuse sont définies en périphérie par l'expression de CD11c, CMHII et, CD11b ou CD8 α . On peut ainsi les distinguer en DC CD11c⁺CMHII⁺CD11b⁺ et DC CD11c⁺CMHII⁺CD8 α ⁺. Dans les tissus muqueux, des sous-types de DC sont également retrouvés : CD11c⁺CMHII⁺CD103⁺CD11b⁺ et CD11c⁺CMHII⁺CD103⁺CD11b^{neg} ainsi que des monocytes dits inflammatoires que nous présenterons par la suite. Durant le processus d'activation dépendant de signaux microbiens, ces CPA migrent directement ou à travers le système lymphatique vers les organes lymphoïdes associés aux muqueuses ("mucosa-associated lymphoid tissue" ou MALT), et y présentent les antigènes, ce qui enclenche finalement la réponse immunitaire adaptative. Cette plasticité de migration constitue une caractéristique essentielle des CPA.

Les monocytes sont recrutés à partir de la circulation sanguine par les chimiokines CCL2, CCL3, CCL7 et CX₃CL1 aussi bien à l'homéostasie pour renouveler les macrophages et les cellules dendritiques que lors d'inflammation (Auffray *et al.*, 2009). Les monocytes classiques et les monocytes inflammatoires peuvent se différencier en DC et macrophages afin de participer à la mise en place de la réponse adaptative (Geissmann *et al.*, 2010; Le Borgne *et al.*, 2006; Salazar-Gonzalez *et al.*, 2006). Chez l'Homme, les monocytes circulants sont divisés en deux sous-populations selon l'expression des marqueurs CD14 et CD16 (ou Fc γ RIII) (Passlick *et al.*, 1989). Les monocytes CD14⁺ qui représentent 90% des monocytes circulants expriment les marqueurs CCR1, CCR2 et CXCR2 alors que la population CD16⁺ (10% restants) exprime CX₃CR1 (Ancuta *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2000). La fréquence des monocytes CD16⁺ augmente lors d'une infection, ces monocytes sont donc appelés monocytes inflammatoires (Thieblemont *et al.*, 1995). Les monocytes murins sont différenciés par l'expression différentielle des marqueurs Ly6C, CX₃CR1, et CCR2 (Geissmann *et al.*, 2003). Chez la souris, les monocytes inflammatoires sont Ly6C⁺CCR2⁺CX₃CR1⁺ alors que les monocytes dit "résidents" sont définis comme Ly6C^{-/int}CCR2^{neg}CX₃CR1⁺.

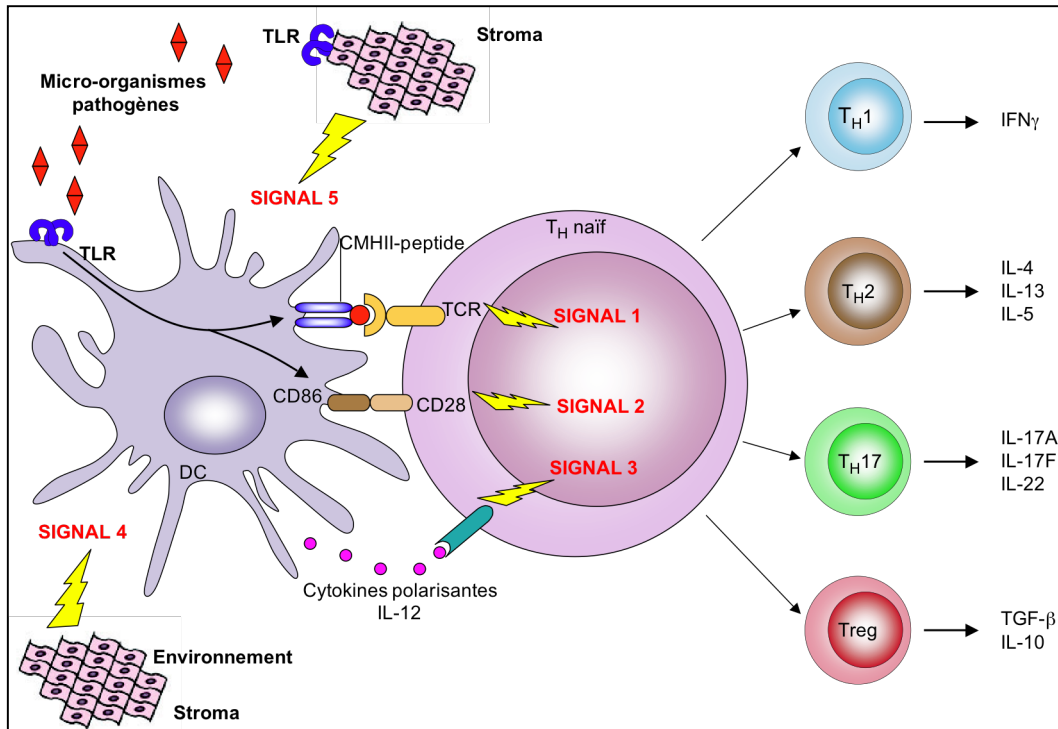


Figure 9 : Mécanismes d'activation des lymphocytes T CD4⁺ par les cellules dendritiques.

L'activation des lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ (T_H) est dépendante de plusieurs signaux. Trois signaux sont induits par l'interaction des micro-organismes avec les récepteurs de la réponse innée des cellules présentatrices d'antigènes. Dans ce modèle est présentée l'activation mettant en jeu une cellule dendritique (DC) et un "Toll-Like Receptor ou TLR". Après activation des TLR, les DC produisent (1) le signal antigénique qui provient de la présentation de peptides antigéniques par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII) des DC au récepteur (T Cell Receptor ou TCR) du lymphocyte T_H naïf, (2) le signal de co-stimulation qui se traduit par l'expression en surface de la DC de molécules de co-stimulation comme CD80, CD86 ou CD40, et (3) le signal de polarisation qui correspond à des cytokines sécrétées par la DC tels que l'IL-12. L'environnement du tissu hébergeant la DC peut apporter deux signaux supplémentaires ayant un impact sur la réponse T. Les fonctions présentatrices des DC peuvent être influencées par des facteurs environnementaux constitutifs (comme le TGF-β dans les muqueuses) du tissu dans lequel la DC a résidé. Finalement, la réponse innée du tissu est également un signal modulateur : les cellules structurales (stroma) sont à même de répondre à une stimulation TLR et ainsi moduler la maturation fonctionnelle des DC.

2- Les TLR contrôlent l'initiation de la réponse lymphocytaire

L'activation des lymphocytes T naïfs par les CPA requiert 3 signaux (1) l'interaction TCR-CMH/peptide, (2) une co-stimulation apportée par les molécules CD80/CD86 et (3) un environnement cytokinique polarisant (Figure 9). Dans le cas d'une infection, la présence microbienne est détectée par les TLR présents à la surface des CPA (Joffre *et al.*, 2009). Les TLR induisent alors la maturation fonctionnelle des CPA provoquant l'augmentation de l'expression des molécules de CMH associées à la présentation des épitopes d'antigènes microbiens et la mise en place de molécules de co-stimulation à la membrane cellulaire (Banchereau et Steinman, 1998). Les groupes des Dr. Medzhitov et Dr. Akira en utilisant des souris déficientes ont montré l'importance de la maturation de DC via la signalisation TLR/MyD88 dans le contrôle de la réponse T (Kaisho et Akira, 2001; Schnare *et al.*, 2001). Le troisième signal des CPA nécessaire à l'activation d'une réponse adaptative, est constitué de cytokines qui favorisent la différenciation des cellules T naïves vers un phénotype Th1, Th2, ou Th17 tout en inhibant l'activité suppressive des cellules régulatrices (T_{reg}). Les cellules Th1 produisent de l'IFN- γ , de l'IL-2 et de la lymphotoxine- β (LT- β), favorisant de ce fait une défense contre les pathogènes intracellulaires. Les cellules Th2 produisent de l'IL-4, de l'IL-13 et de l'IL-5 nécessaires à l'induction des réponses contre les pathogènes extracellulaires. Les cellules Th17 produisent de l'IL-17 et de l'IL-22 qui jouent un rôle important pour la clairance de pathogènes extracellulaires des muqueuses tels que les champignons (*Aspergillus*, *Candida*) et les bactéries (*K. pneumoniae*, *C. rodentium*). Les études décrivent ainsi des MAMP pro-Th1 (ARN double brin ou CpG), pro-Th2 (agoniste synthétique de TLR2), mixte Th1-Th2 (LPS ou flagelline) ou pro-Th17 (agonistes des récepteurs Nod1 et Nod2) (Agrawal *et al.*, 2003; Didierlaurent *et al.*, 2004; Fritz *et al.*, 2007). Les cytokines sécrétées par les CPA en réponse aux agonistes TLR sont essentielles à la différenciation des lymphocytes Th (IL-12p70 pour Th1, IL-12p40 pour Th2 et IL-23 pour Th17) et pour surmonter les effets suppressifs des lymphocytes T_{reg} (Pasare et Medzhitov, 2003). De plus, la nature et l'amplitude de la maturation fonctionnelle de la CPA est régulée par des facteurs intrinsèques au tissu (signal 4) dans lequel la cellule réside comme le TGF β ou la vitamine A (Abreu, 2010). Finalement, le danger microbien est également intégré par les cellules structurales du tissu qui génèrent des signaux additionnels rapportant le degré de stress tissulaire (signal 5). Par exemple, la signalisation TLR dans les cellules épithéliales produit un nombre important de médiateurs pro- et anti-inflammatoires tels que les cytokines BAFF, APRIL ou TSLP qui influencent les réponses T et anticorps (voir ci-dessus) (Abreu, 2010; He *et al.*, 2007). *In vivo*, il est remarquable que seule une action directe des agonistes TLR sur les CPA conduit à leur maturation fonctionnelle, *i.e.* leur capacité à induire la différenciation des lymphocytes T (Joffre *et al.*, 2009; Sporri et Reis e Sousa, 2005). L'activité adjuvante des TLRs a également été associée à l'effet "cargot" (Blander, 2007). Cet effet repose sur la co-localisation de l'antigène et de l'agoniste TLR au sein d'un même

endosome/phagosome intracellulaire, permettant ainsi un apprêtement et une présentation optimale de l'antigène aux cellules T.

3- Le recrutement des CPA et la migration dans les tissus lymphoïdes

Des cellules épithéliales intestinales ou pulmonaires stimulées avec des bactéries ou la protéine KpOmpA et la flagelline, respectivement agonistes de TLR2 et TLR5, sécrètent la chimiokine CCL20 (Izadpanah *et al.*, 2001; Pichavant *et al.*, 2006; Sierra *et al.*, 2001; Sirard *et al.*, 2009; Sitaraman *et al.*, 2001). CCL20 permet le recrutement des cellules dendritiques immatures, de cellules T effecteurs/mémoires et de lymphocytes B par le récepteur CCR6 (Schutyser *et al.*, 2003). CCL20 est également exprimé *in vivo* dans les muqueuses respiratoires et intestinales et les amygdales, plus particulièrement quand le tissu est inflammé, infecté ou stimulé par la signalisation TLR (Dieu *et al.*, 1998; Izadpanah *et al.*, 2001; Nempont *et al.*, 2008). À l'homéostasie, l'épithélium associé aux plaques de Peyer, i.e. des organes lymphoïdes associés à l'intestin, représente un site privilégié d'expression permanente de CCL20 (Cook *et al.*, 2000). Cet épithélium constitue également un site unique spécialisé dans l'échantillonnage constitutif des antigènes de la lumière intestinale, leur transport aux cellules sub-épithéliales et l'induction d'une réponse adaptative. L'inactivation du récepteur à la chimiokine CCL20, CCR6, abolit la migration de cellules dendritiques dans les plaques de Peyer (Cook *et al.*, 2000). Ce modèle suggère que la réponse adaptative dans les tissus muqueux est intimement associée à un programme d'expression épithéliale responsable du recrutement des cellules dendritiques. La production de CCL20 dans l'épithélium des plaques de Peyer semble dépendre du récepteur à la LT- β . Le laboratoire a observé que la stimulation de cellules épithéliales par la LT- β déclenche une transcription durable de CCL20 alors que la stimulation via TLR5 est transitoire (Sirard *et al.*, 2009). Par ailleurs, le groupe du Dr Ebert a montré que des motifs microbiens sont à l'origine de la genèse de follicules lymphoïdes isolés (ILF pour Isolated lymphoid follicle) dans un processus dépendant de CCL20 (Bouskra *et al.*, 2008). De plus, dans des expériences de vaccination avec des adjuvants microbiens, CCR6 apparaît essentiel à la stimulation de la réponse adaptative (Le Borgne *et al.*, 2006). Ces analogies à l'homéostasie et à l'infection indiquent vraisemblablement une conservation des mécanismes pour promouvoir le recrutement de CPA par CCL20 et la stimulation d'une réponse adaptative.

Les souris déficientes en CCR6 possèdent moins de cellules dendritiques et ce défaut est associé à une production plus faible d'immunoglobulines sécrétoires A (IgA) contre un antigène administré par voie orale, alors que la réponse systémique reste inchangée (Cook *et al.*, 2000). L'administration intranasale de souris *Ccr6*^{-/-} avec *Aspergillus fumigatus* cause une infection beaucoup plus sévère par rapport à celle des souris sauvages, ce processus est également associé à une réduction du nombre de cellules dendritiques au niveau de la muqueuse pulmonaire (Phadke *et al.*, 2007). De plus, les

épithéliums peuvent sécréter la chimiokine CCL2, responsable du recrutement de monocytes et de DC immatures(Eckmann et Kagnoff, 2001; Osterholzer *et al.*, 2005).

4- Compartimentation de la réponse adaptative

Les muqueuses possèdent des sites inducteurs, où les lymphocytes naïfs sont activés par des CPA, et des sites effecteurs, où les cellules effectrices (lymphocytes activés) contrôlent localement les agents infectieux. Par exemple, les plaques de Peyer, les ganglions mésentériques, et les ILF constituent les principaux sites d'induction des réponses immunitaires intestinales. Les sites effecteurs muqueux sont constitués par l'épithélium de revêtement et la *lamina propria* où se concentrent les lymphocytes T et les plasmocytes qui produisent les anticorps sécrétoires, notamment les IgA. L'antigène est apporté aux CPA via des cellules épithéliales spécialisées dans l'échantillonnage des antigènes (cellules M), est directement capturé dans la lumière de la muqueuse grâce aux dendrites intra-épithéliales des CPA ou est capturé après passage passif de la barrière épithéliale suite à une destruction des cellules structurales. Les pathogènes, porteurs de motifs constituant des signaux de danger (MAMP), sont reconnus par des PRR incluant les TLR exprimés par les cellules épithéliales et les CPA. Ensuite, les CPA migrent vers les sites inducteurs pour y activer les lymphocytes naïfs. Les lymphocytes B et T activés (plasmocytes sécréteurs d'anticorps ou cellules Th1, Th2 ou Th17) dans les sites inducteurs se dispersent sélectivement dans les tissus effecteurs muqueux.

La migration des cellules effectrices vers les muqueuses dépend de l'environnement muqueux. Leur domiciliation muqueuse est orchestrée par des intégrines et adressines spécifiques des muqueuses comme $\alpha 4\beta 7$ ou CCR9. Les CPA jouent un rôle important dans la migration sélective des lymphocytes muqueux en les conditionnant par des signaux spécifiques comme la vitamine A (Wang *et al.*, 2010). Ainsi, la compartimentation de la réponse adaptative consiste en une redistribution préférentielle des lymphocytes activés au niveau de la muqueuse d'origine.

III- Les cytokines IL-17 et IL-22 : des médiateurs clés de l'immunité des muqueuses

De récentes études soulignent la contribution des cytokines IL-17A, IL-17F et IL-22 dans la défense des muqueuses (Aujla *et al.*, 2008; Ishigame *et al.*, 2009; Onishi et Gaffen, 2010; Wolk *et al.*, 2010). Ces cytokines exacerbent l'immunité des muqueuses en stimulant la production épithéliale (1) de molécules de défense à large spectre d'activité anti-microbienne, (2) de cytokines et de chimiokines qui recrutent et stimulent les neutrophiles et (3) de facteurs de réparation cellulaire et tissulaire (Figure 10).

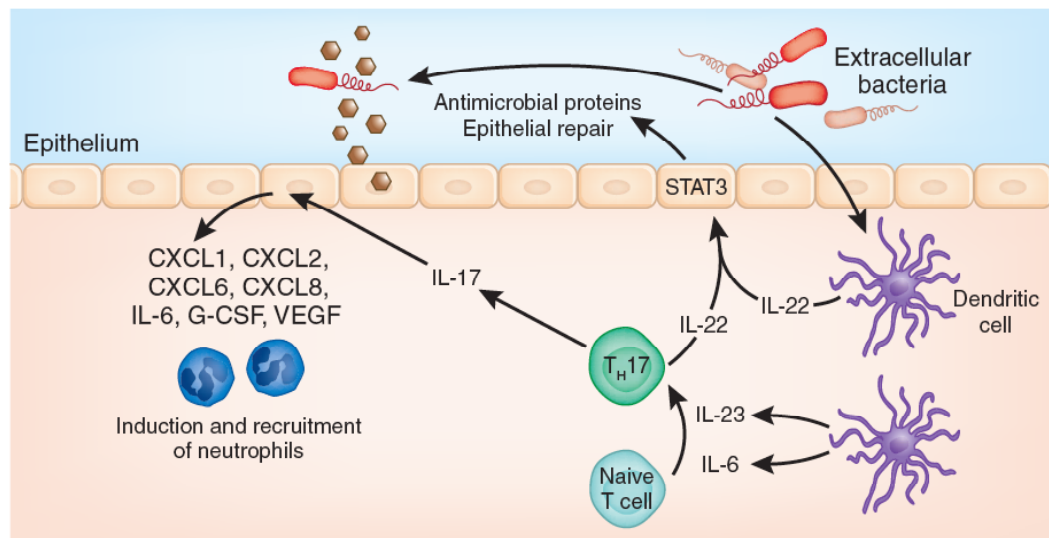


Figure 10 : Contribution des cytokines IL-17 et IL-22 dans l'immunité muqueuse.

Les bactéries pathogènes à tropisme muqueux peuvent induire la production d'IL-17 et d'IL-22 par des cellules immunitaires (dans ce schéma est représentée la production par des lymphocytes effecteurs Th17 spécifiques d'antigènes bactériens). Les cytokines IL-17 et IL-22 agissent en retour sur les cellules épithéliales via leur récepteur respectif. La signalisation via l'IL-17R et l'IL-22R induit la production de protéines de défense anti-microbienne, la sécrétion de chimiokines et cytokines nécessaires au recrutement et à l'activation des neutrophiles. De plus, la cytokine IL-22 stimule les processus de réparation cellulaire et tissulaire favorisant ainsi le retour à l'homéostasie. Ces réponses contribuent dans les muqueuses à l'élimination des bactéries extracellulaires mais également de champignons pathogènes. D'après Laurence, *Nature Medicine* 2009.

A- Structure et fonction des cytokines IL-17 et IL-22

1- Le récepteur IL-17R et ses cytokines spécifiques IL-17A et IL-17F

La famille de la cytokine IL-17 est constituée de 6 membres (IL-17A à IL-17F). Les molécules IL-17A (dénommée également IL-17) et IL-17F sont les cytokines les plus étudiées de cette famille. Elles forment des homodimères ou des hétérodimères (Wright *et al.*, 2007). Des homologues aux cytokines de la famille IL-17 sont retrouvés chez les poissons "lamprey" et "zebrafish" ou le xénope (Tsutsui *et al.*, 2007). Une telle conservation dans l'évolution suggère un rôle majeur de la famille IL-17 dans l'immunité innée. La famille des récepteurs à l'IL17 comprennent 5 membres (IL-17RA à IL-17RE). Ce sont des protéines

transmembranaires qui s'organisent en deux domaines : un domaine extracellulaire de type fibronectine III et un domaine intracellulaire SEFIR, homologue au domaine TIR des TLR (O'Quinn *et al.*, 2008) (Figure 11). Le récepteur aux cytokines IL-17A et IL-17F (ou IL-17R) est ubiquitaire et il est composé des 2 chaînes IL-17RA et d'une chaîne IL-17RC (Gaffen, 2009). Dans les tissus muqueux, de nombreuses activités de l'IL-17A ont été décrites au niveau des cellules non-hématopoïétiques comme les cellules épithéliales. Contrairement à la signalisation JAK-STAT induite par les cytokines IFN- γ , IL4, IL-5 et IL-13, le récepteur IL-17R utilise une voie dépendante d'ACT1, TRAF6 et NF- κ B comparable à celle de la voie TLR (Figure 11). L'IL-17A agit souvent en synergie avec d'autres cytokines comme l'IL-17F et l'IL-22 et active l'expression de gènes pro-inflammatoires similaires à ceux décrits pour la réponse TLR (Tableau 3). Si l'on considère l'épithélium, la similarité est vraiment surprenante. Cette signature immunitaire suggère que les cytokines IL-17 et IL-22 coordonnent l'immunité innée et l'immunité adaptative, à l'instar des TLR.

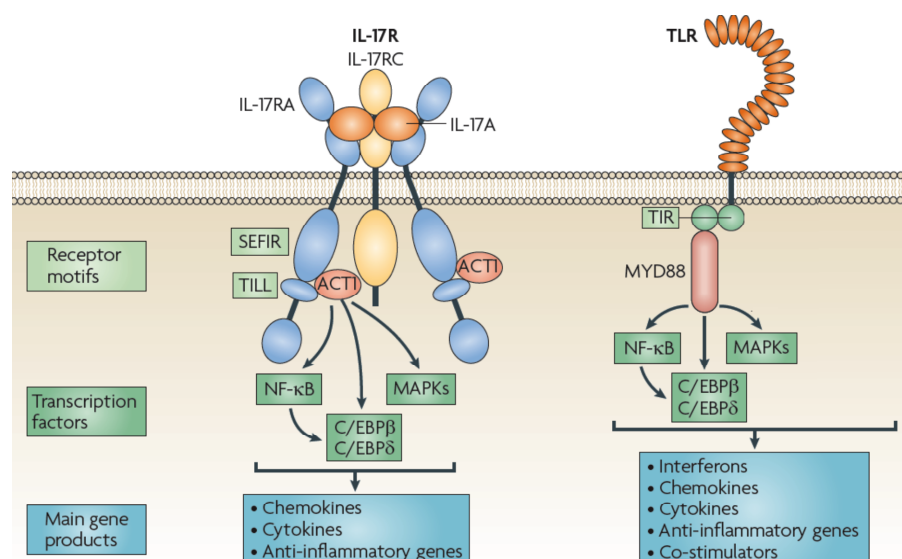


Figure 11 : Comparaison des cascades de signalisation des récepteurs IL-17R et TLR.

Le récepteur à l'IL-17A et IL-17F formé des chaînes IL-17RA et IL-17RC et les TLR possèdent des domaines cytoplasmiques fonctionnels distincts (SEFIR et TIRL versus TIR), recrutent des adaptateurs différents (ACT1 versus MyD88). Cependant, les 2 types de récepteurs convergent vers des voies de signalisations communes : NF- κ B, MAPK et C/EBP. Ces récepteurs activent donc la transcription de gènes de nature similaire en particulier dans les cellules épithéliales. D'après Gaffen *et al*, *Nature Reviews Immunology* 2009.

molécules	tissus	IL-17R	IL-22R	Référence
molécules anti-microbiennes				
β-défensines	peau, poumon	-	+	Wolk, 2004 ; Liang, 2006
protéines S100A	peau, intestin	+	+	Wolk, 2004 ; Zheng, 2008
protéines RegIII	intestin	-	+	Zheng, 2008
lipocaline	poumon	+	+	Chan, 2009
remodelage/intégrité tissulaire				
métalloprotéases MMP	peau, intestin	+	+	Boniface, 2002 ; Andoh, 2005
G-CSF		+	-	Happel, 2005
claudine	intestin	+	ND	Kinugasa, 2000
Proteines de l'inflammation				
protéines SAA	foie	+	+	} Dumoutier, 2000
haptoglobine	foie	-	+	
α1 anti-chymotrypsine	foie	-	+	
Chimiokines				
protéines CXC (CXCL1, 2, 3, 6, 8)	intestin, poumon, peau	+	+/-	Andoh, 2005 ; Wolk, 2009 ; Wolk, 2004
protéines CC (CCL2, 7, 20)	intestin, poumon, peau	+	+/-	
facteur de différenciation cellulaire				
profillagrin	peau	ND	+	} Boniface, 2002
keratin	peau	ND	+	
calmodulin	peau	ND	+	

Tableau 3 : Gènes cibles des récepteurs IL-17R et IL-22R.

La signalisation des récepteurs à l'IL-17 et à l'IL-22 active la transcription d'un panel similaire de gènes. Ainsi, les gènes codant des molécules anti-microbiennes, des molécules impliquées dans le remodelage et/ou la réparation tissulaire, des protéines de l'inflammation ou des chimiokines sont surexprimés après stimulation des récepteurs. En revanche, la signalisation régule négativement la transcription de gènes codant des facteurs de différenciation cellulaires. (+ : transcription activée par le récepteur, - : pas d'expression ; +/- : expression variable ou faible, ND : non défini).

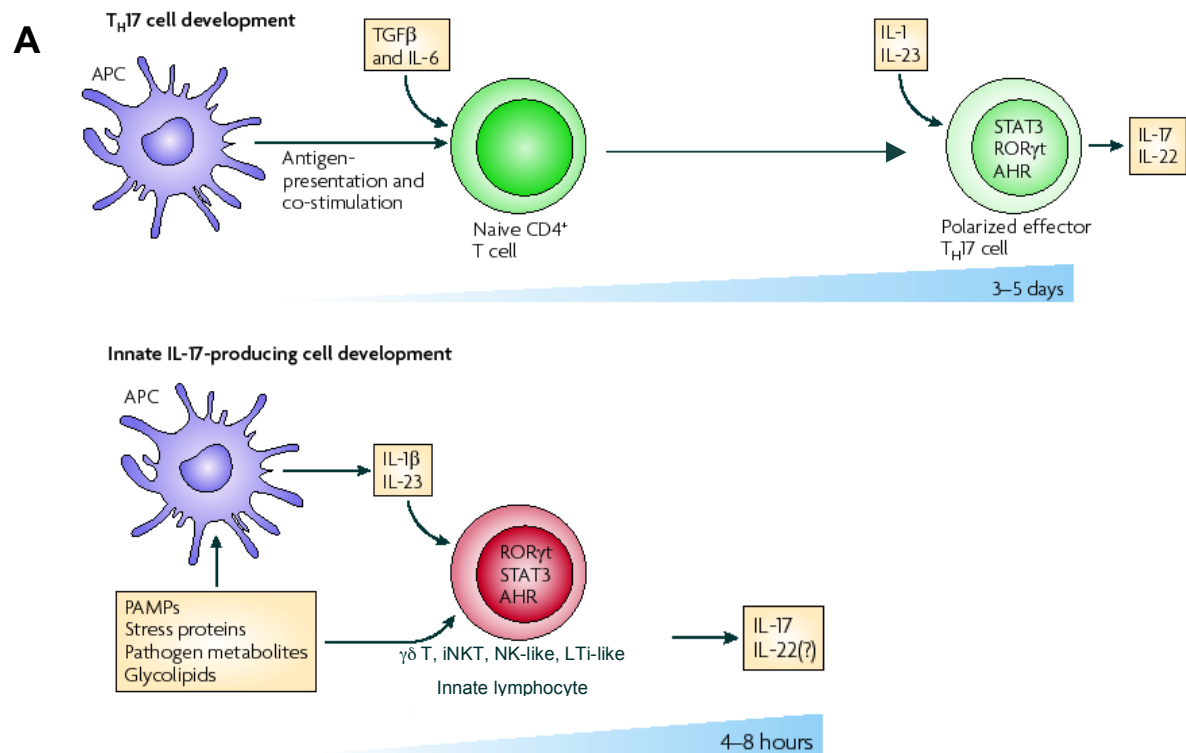
2- La cytokine IL-22 et son récepteur épithélial

L'IL-22 est une cytokine de la famille de l'IL-10 (22% d'identité) qui joue un rôle dans l'inflammation, la surveillance et l'homéostasie des tissus muqueux. Elle a été caractérisée pour la première fois par Dumoutier et collaborateurs où elle était nommée IL-TIF pour "IL-10-related T cell derived inducible factor" (Dumoutier *et al.*, 2000). Le récepteur à l'IL-22 se compose des sous-unités IL-22R1 et IL-10R2 (Kotenko *et al.*, 2001). L'IL-22 a une forte affinité pour la chaîne IL-22R1 (K_d compris entre 1 et 20 nM) (Logsdon *et al.*, 2004). La chaîne IL-10R2 a une forte affinité pour le complexe IL-22/IL-22R1 ce qui permettrait de stabiliser le complexe (Li *et al.*, 2004). La partie extracellulaire se compose de 200 acides aminés organisés en deux domaines fibronectine III en tandem et d'une zone de liaison du ligand. Comme les autres membres de la famille de l'IL-10, après interaction avec son récepteur, l'IL-22 active une voie de signalisation JAK/STAT (Wolk *et al.*, 2010). JAK1 s'associe au domaine intracellulaire de l'IL-22R1, ce qui phosphoryle STAT3 qui peut alors se dimériser et migrer dans le noyau pour activer la transcription des gènes cibles. JAK1 peut également activer les voies JNK, p38 kinase et ERK1/2. La chaîne IL-10R2 est exprimée sur toutes les cellules alors que la chaîne IL-22R1 est essentiellement retrouvée sur les cellules structurales (pancréas et foie) ou les cellules épithéliales de la peau, des reins et des systèmes digestif (intestin) et respiratoire (poumon et trachée) (Wolk *et al.*, 2004). L'IL-22 est produite par des cellules immunitaires et elle cible exclusivement les cellules épithéliales et structurales dans les tissus. L'impact de l'IL-22 sur la signalisation épithéliale a été mis en exergue dans une étude récente avec des animaux portant une déficience conditionnelle de STAT3 dans les cellules épithéliales intestinales (Pickert *et al.*, 2009). L'IL-22 renforce la défense et la régénération des tissus. Ainsi, l'IL-22 induit dans l'intestin et le poumon l'expression épithéliale (1) de composés antimicrobiens tel les lectines RegIII β et RegIII γ ou les défensines, (2) de protéines impliquées dans le remodelage cellulaire, (3) de protéines de l'inflammation, (4) de chimiokines et (5) réduit l'expression de protéines de différenciation (Tableau 3). Les différences au sein des voies de signalisation des récepteurs IL-17R et IL-22R suggèrent que l'IL-17 et l'IL-22 ont des actions distinctes : synergiques ou antagonistes. Une étude récente du groupe du Dr Artis a mis en évidence que l'IL-17A pouvait orienter les propriétés de l'IL-22 dans un modèle d'inflammation induite par la bléomycine (Sonnenberg *et al.*, 2010). Des souris déficientes pour l'IL-22 présentent une amélioration de la pathologie induite par la bléomycine suggérant que l'IL-22 est néfaste dans ce modèle. Cependant, la neutralisation de l'IL-22 dans des souris déficientes pour l'IL-17A exacerbe l'inflammation induite par la bléomycine, indiquant que l'IL-22 est protectrice en absence d'IL-17A. Par ailleurs, il a été observé que l'IL-17A et l'IL-17F sont complémentaires pour la protection anti-infectieuse (Ishigame *et al.*, 2009).

B- Les cellules productrices d'IL-17 et d'IL-22

La source des cytokines IL-17A, IL-17F et IL-22 est variée et rassemble des cellules de l'immunité adaptative comme de l'immunité innée chez l'Homme et la souris. Les lymphocytes T auxiliaires Th17 ont été les premières cellules identifiées comme source d'IL-17A, d'IL-17F et d'IL-22 (Figure 12). Ces lymphocytes se différencient sous l'action d'une combinaison des cytokines IL-1 β , IL-6, TGF- β et IL-23 (Cua et Tato, 2010). La réponse Th17 est particulièrement efficace contre des pathogènes extracellulaires à tropisme pulmonaire et intestinal (Saijo *et al.*, 2010; Wozniak *et al.*, 2010). Plus récemment, la notion de lymphocytes Th22, cellules exclusivement productrices d'IL-22 a été introduite chez l'Homme (Duhon *et al.*, 2009).

La production d'IL-17 et/ou d'IL-22 peut également être induite en quelques heures après une infection muqueuse (Zheng *et al.*, 2008b), temps trop court pour la différenciation des cellules Th17. De plus, il a été observé que l'IL-23 induisait la production d'IL-17 et d'IL-22 dans des souris *Rag2*^{-/-}, ayant ni lymphocytes B ni lymphocytes T (Uhlir *et al.*, 2006). Il existe donc des cellules innées productrices d'IL-17 et/ou d'IL-22. Des études ont montré que les lymphocytes $\gamma\delta$ sont d'importants producteurs d'IL-17 lors d'inflammations auto-immunes ou de maladies infectieuses (Lockhart *et al.*, 2006; Sutton *et al.*, 2009). Les lymphocytes $\gamma\delta$ sont connus pour jouer un rôle protecteur dans les muqueuses en particulier en réponse à un stress infectieux. Il est intéressant de noter que ces cellules expriment de nombreux PRR dont TLR2 (Hayday, 2009). D'autres cellules lymphoïdes innées (CLI) capables de produire rapidement l'IL-17 et/ou l'IL-22 ont récemment été décrites les cellules NK-like "Natural Killer-like" qui expriment le marqueur NKp46, les cellules iNKT activables par l' α -galactosyl ceramide, les cellules LTI-like "Lymphoid tissue inducer-like cells" et les CLI intestinaux (Figure 12) (Colonna, 2009; Cua et Tato, 2010). Toutes ces populations sont rares en périphérie, mais semblent plus abondantes dans les muqueuses. L'absence de marqueur spécifique des différentes CLI et de modèles déficients en CLI est actuellement un obstacle majeur à la caractérisation fonctionnelle des CLI dans l'immunité et à la détermination des relations entre ces populations. Certains marqueurs sont exprimés par toutes les CLI et les lymphocytes Th17 et Th22 comme ROR γ t et CCR6 dont le ligand CCL20 est exprimé par les cellules épithéliales des plaques de Peyer ou les cellules activées par les agonistes TLR (Cook *et al.*, 2000; Sierro *et al.*, 2001). À l'instar des lymphocytes Th17, la capacité des CLI à produire de l'IL-17 et de l'IL-22 est sous la dépendance de CPA exprimant l'IL-23 et l'IL-1 β . Finalement, des travaux récents décrivent des CLI produisant des cytokines Th2 comme l'IL-4 et l'IL-13, essentielles dans le contrôle des infections parasitaires (Neill *et al.*, 2010).



B

Type cellulaire	Phénotype	Espèce	Cytokines	Tissus	Référence
Lymphocytes Tγδ	RoRγt+CCR6+CD3+CD27-	souris, Homme	IL-17 et IL-22	intestin, peau	Martin, 2009
Cellules NK-like	RoRγt+CCR6+CD3- NKp46+	souris, Homme	IL-17 et IL-22	intestin, peau	Crellin, 2010; Luci, 2009
Cellules iNKT	RoRγt+CCR6+CD3+CD1d+NK1.1-	souris	IL-17 et IL-22	foie, poumons, peau	Michel, 2008
Cellules LTI-like	RoRγt+CCR6+CD3-CD4+KIT+THY1+	souris, Homme	IL-17 et IL-22	lamina propria, rate	Buonocore, 2010
CLI Intestinaux	RoRγt+CCR6+CD3-CD4-KIT-THY1+SCA1+	souris, Homme	IL-17, IL-22 et IFNγ	lamina propria	Buonocore, 2010

Figure 12 : Les cellules lymphoïdes innées productrices d'IL-17 et d'IL-22.

(A) Mécanismes de différenciation des cellules productrices d'IL-17 et d'IL-22. La polarisation des lymphocytes T en cellules effectrices Th17 nécessite plusieurs jours après la stimulation antigénique. Elle requiert un environnement riche en cytokines IL-6, TGF-β, IL-23 et/ou IL-1β. Les cellules lymphoïdes innées qui résident dans les tissus muqueux et lymphoïdes sont activées en présence d'IL-23 et/ou d'IL-1β et d'un signal de danger microbien ou endogène. Elles produisent l'IL-17 et/ou IL-22 dans les heures suivant la stimulation. (B) Nature, phénotype et localisation des cellules lymphoïdes innées productrices d'IL-17 et d'IL-22. (CLI : Cellules lymphoïdes innées). D'après Cua, *Nature Reviews Immunology* 2010.

C- Contribution des cytokines IL-17 et IL-22 dans l'immunité anti-infectieuse

IL-17 et IL-22 participent à la mise en place d'immunité contre des pathogènes bactériens et fongiques (Figure 13). L'activité de ces cytokines semble s'exprimer tout particulièrement dans les muqueuses intestinales et respiratoires. Récemment, l'émergence des réponses Th17 intestinales a été corrélée à la colonisation par une bactérie commensale particulière (bactérie filamenteuse segmentée ou SFB), apparentée à l'espèce *Clostridia* (Gaboriau-Routhiau *et al.*, 2009). La réponse Th17 est spécifiquement activée par des infections muqueuses avec des pathogènes extracellulaires (Conti *et al.*, 2009; Ishigame *et al.*, 2009; Sellge *et al.*, 2010). Par exemple, la voie respiratoire est efficace pour l'induction de réponses Th17 (Pepper *et al.*, 2010; Sellge *et al.*, 2010; Zygmunt *et al.*, 2009). L'IL-17, selon le contexte infectieux, est active seule ou en synergie avec l'IL-22 et l'IL-17F. L'effet immunitaire majeur de l'IL-17A est le recrutement de neutrophile au site d'infection (Gaffen, 2009; Michel *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2001). Dans un modèle murin de pneumonie à *Klebsiella pneumoniae*, la neutralisation de l'IL-22 provoque la mort des souris et une dissémination rapide des bactéries du poumon vers la rate. Ces données suggèrent une perte des fonctions barrière de l'épithélium pulmonaire en absence d'IL-22 (Aujla *et al.*, 2008). Dans un modèle d'infection intestinale, des souris déficientes pour l'IL-22 sont plus sensibles à l'infection par *Citrobacter Rodentium* (Satoh-Takayama *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2008b). La protection est médiée par l'IL-22 qui induit en cascade la sécrétion de la molécule anti-microbienne RegIII β . La cytokine IL-22 protège également les tissus intestinaux et le foie des désordres inflammatoires (Zenewicz *et al.*, 2007; Zenewicz *et al.*, 2008). L'IL-22 est donc un acteur clé des défenses anti-infectieuses, de la réparation tissulaire et de l'intégrité des barrières épithéliales.

Des études ont mis en évidence des effets pathologiques de l'IL-22 et de l'IL-17. Des patients atteints de psoriasis présentent des taux élevés d'IL-22 dans leur sérum. Dans leurs biopsies cutanées, le taux d'IL-22 est plus élevé comparé aux individus contrôles (Wolk *et al.*, 2006). Dans un modèle murin de psoriasis, les souris traitées avec des anticorps neutralisants dirigés contre l'IL-22, ne développent pas de pathologie cutanée (Ma *et al.*, 2008). De la même façon, la production d'IL-17 a été associée à l'arthrite rhumatoïde (Gaffen, 2009).

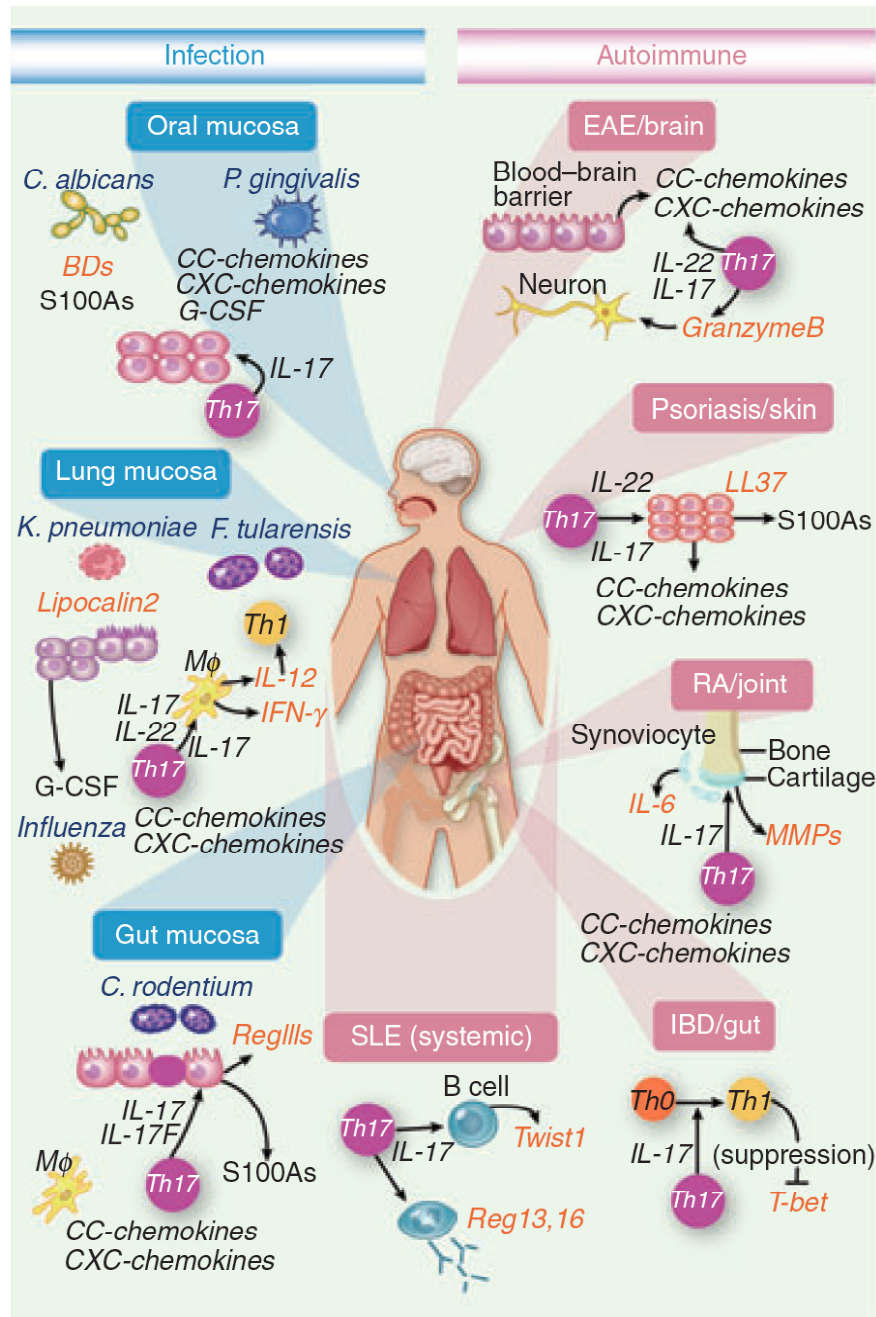


Figure 13 : Protections et pathologies liées à la réponse IL-17/IL-22.

Schéma représentatif des gènes cibles de la signalisation IL-17 (ou IL-22) impliqués dans la défense anti-microbienne et des pathologies auto-immunes. En bleu sont représentées les infections muqueuses où la signalisation IL-17/IL-22 joue, le plus souvent, un rôle bénéfique ; en rose les maladies auto-immunes où la signalisation est plutôt délétère. (BDs : β -défensines, M Φ : macrophages, Th : lymphocyte T CD4⁺ auxiliaire, SLE : lupus érythémateux systémique, RA : arthrite rhumatoïde, IBD : maladies inflammatoires de l'intestin, EAE : encéphalomyélite auto-immune expérimentale). D'après Onishi et al, *Immunology* 2010.

IV- La flagelline, un motif bactérien spécifique des muqueuses et de l'immunité

A- Structure et fonction du flagelle bactérien

Le flagelle est l'organelle permettant à la bactérie de se déplacer ou "nager". Le filament flagellaire fait 120 à 250 Angströms de diamètre et atteint une longueur de 15 µm chez les salmonelles. Il se compose de trois parties : le corps basal, le crochet et le filament (Macnab, 2003). Le corps basal du flagelle constitue un système de sécrétion de type III. Les protéines sécrétées participent à l'élaboration du crochet et de la structure filamentaire du flagelle (Figure 14A). Le flagelle bactérien a une fonction analogue à celle d'une hélice fixée à un moteur. Le moteur est inséré dans la membrane cytoplasmique et mis en rotation grâce à la force proton-motrice. Selon le nombre et la disposition des flagelles, la bactérie est qualifiée de monotriche ou multitriche (pour un ou plusieurs flagelles) et de polaire (position en extrémité), ou péritriche (sur toute la surface).

Les chimiorécepteurs des bactéries détectent les facteurs environnementaux et assurent une mobilité orientée vers un ciblage spécifique. Dans les tissus des mammifères, la mobilité bactérienne représente donc un mécanisme de virulence. En effet, la mobilité d'*Helicobacter pylori* (Ottemann et Lowenthal, 2002) ou *Pseudomonas aeruginosa* (Drake et Montie, 1988) est respectivement indispensable pour l'infection de l'estomac ou du poumon. La colonisation de la muqueuse intestinale par *V. cholerae* nécessite aussi la mobilité (Krukonis et DiRita, 2003). L'expression du flagelle chez les *E. coli* uropathogènes permet à la bactérie d'atteindre la partie supérieure du tractus urinaire (Lane *et al.*, 2007).

Le flagelle a également été associé à l'adhésion et l'invasion des muqueuses en agissant comme une adhésine. La flagelline de *P. aeruginosa* peut se lier à une mucine (Muc1) du poumon (Lillehoj *et al.*, 2002). De même, certains sérotypes d'*E. coli* adhèrent à la muqueuse intestinale en utilisant des mécanismes dépendant du flagelle (Giron *et al.*, 2002). Par ailleurs, l'appareil de sécrétion de type III du flagelle a été proposé comme système de sécrétion de facteurs de virulences. Le flagelle de *Yersinia enterocolitica* permet ainsi la sécrétion de la phospholipase : YplA (Young *et al.*, 1999).

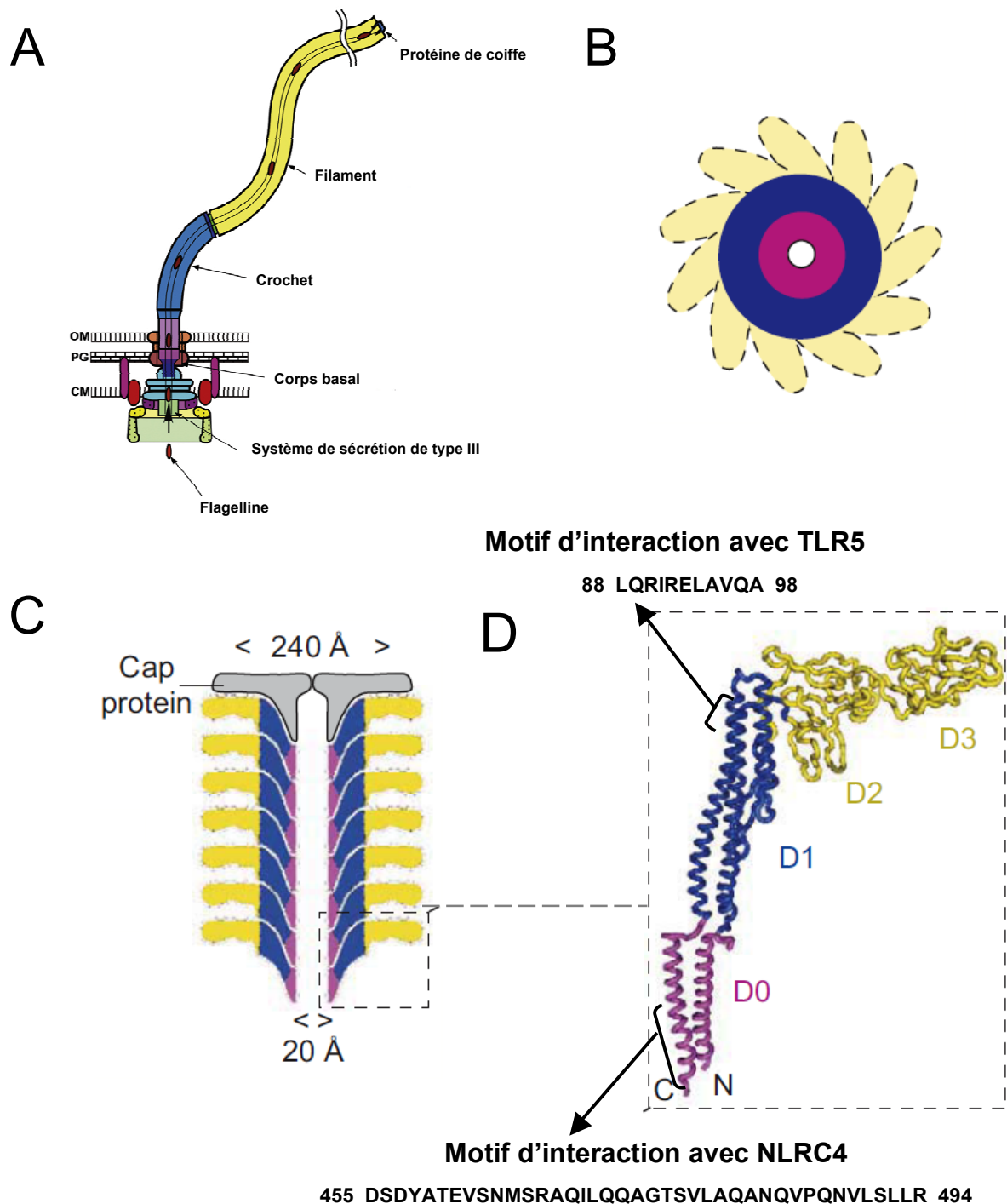


Figure 14 : Structure et organisation tridimensionnelle du flagelle et de la flagelline.

(A) Le flagelle se décompose en trois parties : le corps basal qui agit comme un moteur, le crochet qui fonctionne comme un axe et le filament qui fonctionne comme une hélice. La flagelline, molécule structurale du flagelle, est injectée par le système de sécrétion de type III. (OM : membrane externe, PG : peptidoglycane, CM : membrane cytoplasmique) D'après Minamino, 2008. Vue schématique du flagelle en coupe transversale (B) et en coupe longitudinale (C). (D) Représentation de la structure tridimensionnelle de la flagelline de *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. La flagelline se compose des domaines suivants : des hélices α en position terminale (domaine D0 en rose), des hélices α centrales (domaine D1 en bleu), et d'un domaine hypervariable organisé en feuillet β (D2 et D3 en jaune). La signalisation via TLR5 nécessite le motif formé des acides aminés 89-96 du domaine D1. La flagelline peut également être détecté par le récepteur cytoplasmique NLRC4 (ou IPAF) qui active l'immunité innée via l'inflammasome. L'activation de NLRC4 dépend des acides aminés 455-494 du domaine D0 de la flagelline (partie C-terminale).

B- La flagelline, le motif bactérien agoniste de TLR5

1- Organisation structurale

Le filament flagellaire est constitué d'une seule protéine organisée en polymère : la flagelline. Selon l'espèce bactérienne, la flagelline est dénommée FliC, FljB, FlaA, etc. La flagelline, exportée par le système de sécrétion de type III s'associe spontanément à l'extrémité du filament avec le monomère adjacent permettant la croissance hélicoïdale du flagelle. Parmi les flagellines des bactéries, la flagelline FliC de *S. typhimurium* est la plus étudiée et la seule dont la structure tri-dimensionnelle a été obtenue à ce jour (Figure 14).

Les flagellines bactériennes sont constituées de 250 à 1080 acides aminés en fonction des espèces. La protéine FliC de *S. typhimurium* est composée de 495 acides aminés. Les études de cristallographie ont mis en évidence quatre domaines distincts D0, D1, D2 et D3 au sein de la flagelline (Samatey *et al.*, 2001; Yonekura *et al.*, 2003) (Figure 14D). Les domaines D0 et D1 sont formés des 160 acides aminés de l'extrémité amino-terminale, et des 90 résidus de l'extrémité carboxy-terminale. Les séquences primaires des domaines D0 et D1 sont très conservées entre les flagellines. Le domaine D0, n'est pas structuré en solution mais il adopte une structure en hélice α dans le flagelle. Le domaine D1 est organisé principalement en hélice α . Chaque surface convexe des domaines D0 et D1 d'une molécule de flagelline interagit avec la zone concave de ces mêmes domaines dans la flagelline adjacente, permettant ainsi l'élaboration du polymère stable. Les domaines D2 et D3 qui forment la région centrale de la protéine ont des séquences primaires extrêmement variables d'une bactérie à une autre. Cette variation est la base de la classification sérotypique H chez les entérobactéries.

2- Reconnaissance par le TLR5

À la fin des années 1990, les flagelles ont été identifiés comme des médiateurs aux propriétés pro-inflammatoires sur diverses cellules. En effet, des flagelles de *Salmonella enterica* Serovar Typhi induisent la sécrétion de cytokines par des monocytes humains (Wyant *et al.*, 1999). Cette activation nécessite un récepteur d'origine protéique à la surface des cellules (McDermott *et al.*, 2000). La flagelline isolée sous forme monomérique a été ensuite définie comme le principe actif de la réponse pro-inflammatoire (Steiner *et al.*, 2000). L'injection par voie intrapéritonéale de flagelline, à des souris résistantes au LPS (souris C3H/HeJ), entraîne l'induction de médiateurs pro-inflammatoires tels que le TNF- α , l'IL-6, l'IL-10, l'IL-12p40 et CCL3 (MIP-1 α) (Eaves-Pyles *et al.*, 2001). En 2001, le groupe du Dr. Aderem a montré que TLR5 est le récepteur activé par la flagelline responsable de ces effets biologiques (Hayashi *et al.*, 2001). TLR5 nécessite MyD88 pour activer une signalisation pro-inflammatoire dépendante de NF- κ B et des MAPKs (Figure 5A).

La région de la flagelline FliC responsable des propriétés inflammatoires a été analysée à l'aide de mutants ponctuels, de mutants d'insertion et de comparaisons de

séquences de flagellines compétentes ou non pour l'activation de TLR5. La délétion des domaines D0 et D1 abolit toute capacité de la flagelline à activer TLR5. Les mutations ponctuelles réduisant significativement les propriétés immuno-stimulatrices induisent également une perte de la fonction de mobilité du flagelle. De plus, la flagelline active TLR5 uniquement sous une forme monomérique (Smith *et al.*, 2003). Des études ont mis en évidence que les α - et ϵ -protéobactéries (incluant *Campylobacter*, *Helicobacter*, et *Bartonella*) produisent une flagelline incapable d'activer TLR5 (Andersen-Nissen *et al.*, 2005). Ces flagellines diffèrent particulièrement de celles des γ -proteobactéries dans la région correspondant aux acides aminés 89 à 96 de la flagelline de *S. typhimurium*. La substitution du motif 89-96 par celui de la flagelline d'*Helicobacter* rend inactive la flagelline FlhC (Figure 14) (Andersen-Nissen *et al.*, 2005). L'interaction directe entre la flagelline et TLR5 n'a pas été formellement démontrée. Cependant, la flagelline a été immunoprécipitée avec TLR5 (Mizel *et al.*, 2003). Le récepteur TLR5 humain possède 859 acides aminés, dont 637 forment le domaine extracellulaire. Le site de reconnaissance de la flagelline est localisé dans la zone centrale du domaine extracellulaire de TLR5 (entre les résidus 174 et 402) (Andersen-Nissen *et al.*, 2007b).

3- Reconnaissance de la flagelline par les NLR

Les récepteurs NLR contiennent trois domaines distincts : (1) un domaine riche en LRR qui reconnaît le ligand microbien, (2) un domaine qui régule l'oligomérisation des NLR, et (3) un domaine effecteur tel le domaine de recrutement de caspase (CARD). Les NLR sont synthétisés sous une forme inactive avec leur domaine LRR replié sur la protéine empêchant ainsi toute oligomérisation. La fixation du ligand provoque l'oligomérisation et le démarrage de la signalisation. La caspase-1 est recrutée et activée par le domaine CARD des NLR, et va participer à la maturation et la sécrétion des cytokines comme l'IL-1 β et l'IL-18. Les récepteurs IPAF (NLRC4) ou NAIP5 stimulent rapidement la caspase-1 en réponse à la flagelline de *S. typhimurium* ou *L. pneumophila* (Amer *et al.*, 2006; Lamkanfi *et al.*, 2007). Récemment, il a été démontré qu'un motif à l'extrémité carboxy-terminale de la flagelline de *S. typhimurium* est nécessaire à la reconnaissance par IPAF et NAIP5 (Figure 14D) (Lightfield *et al.*, 2008; Miao *et al.*, 2010). Le système immunitaire inné a donc évolué vers deux voies d'activation indépendantes pour détecter les flagellines bactériennes, ce qui permettrait de compenser une défaillance ou un échappement microbien à l'une ou l'autre des voies TLR ou NLR. À ce jour, l'activité de NLRC4 ou NAIP5 n'a pu être observé que sur des macrophages infectés par des bactéries flagellées ou transfectées artificiellement avec la flagelline. Des évidences significatives de l'effet des NLR *in vivo* sur l'immunité restent à rechercher.

4- Activité biologique de la flagelline *in vivo*

Les effets biologiques de la flagelline sur TLR5 ont été décrits dans divers systèmes cellulaires et animaux (pour revues, voir (Abreu, 2010; Ramos *et al.*, 2004; Rumbo *et al.*, 2006). Dans les cellules épithéliales des muqueuses, la signalisation se traduit par l'activation transcriptionnelle dépendante de NF- κ B de gènes codant des médiateurs inflammatoires comme l'IL-8 et CCL20 (Berin *et al.*, 2002; Rhee *et al.*, 2005; Sierro *et al.*, 2001; Zeng *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2003). De plus, l'expression de TLR5 a été montrée *in vivo* dans ces cellules (Ortega-Cava *et al.*, 2006). La localisation du récepteur TLR5 a été initialement montrée à la surface basolatérale de la lignée épithéliale T84 (Gewirtz *et al.*, 2001). Depuis, plusieurs études ont montré que TLR5 pouvait être exprimé dans le compartiment apical des cellules épithéliales respiratoires et intestinales (Adamo *et al.*, 2004; Bambou *et al.*, 2004; Schuller *et al.*, 2009). Chez la souris, l'instillation intranasale de la flagelline provoque des réponses immunitaires (Didierlaurent *et al.*, 2008; Feuillet *et al.*, 2006; Honko et Mizel, 2004; Janot *et al.*, 2009; Morris *et al.*, 2009; Raoust *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2010). Ainsi, une production de cytokines et chimiokines (incluant CXCL1, CXCL2 et CXCL5) par des cellules d'origine non-hématopoïétique provoque le recrutement de neutrophiles dans la lumière broncho-alvéolaire dans un mécanisme dépendant de TLR5. Cette détection est importante dans le cadre d'infections respiratoires avec *P. aeruginosa* (Yu *et al.*, 2010). Au niveau intestinal, des effets biologiques de la flagelline ont également été observés (Burdelya *et al.*, 2008; Liaudet *et al.*, 2002; Rhee *et al.*, 2005; Sirard *et al.*, 2009; Uematsu *et al.*, 2006). Cependant, la contribution de l'épithélium à ces réponses n'a pas été analysée.

L'activation de TLR5 au sein des monocytes, des macrophages et des cellules dendritiques entraîne la production de TNF- α , d'IL-6, d'IL-12p40 et/ou d'oxyde nitrique (Bates *et al.*, 2009; Didierlaurent *et al.*, 2004; Feuillet *et al.*, 2006; McDermott *et al.*, 2000; McSorley *et al.*, 2002; Means *et al.*, 2003; Moors *et al.*, 2001). La flagelline active la maturation des cellules dendritiques et participe au développement de la réponse Th1 et Th2 (Didierlaurent *et al.*, 2004; McSorley *et al.*, 2002). Cependant, les cytokines caractéristiques de la voie Th1 comme l'IL-12p70 ne sont pas produites par les cellules dendritiques après stimulation de TLR5. Contrairement au dogme, TLR5 n'instruit pas, à l'instar des autres TLR, une réponse spécifiquement Th1. Cette particularité de TLR5 peut avoir une importance dans les muqueuses où une réponse Th2 favorise l'émergence d'IgA sécrétoires. Les cellules dendritiques de la *lamina propria* intestinale répondent exclusivement à la flagelline (mais pas au LPS) en produisant de grandes quantités d'IL-6 (Uematsu *et al.*, 2006). De plus, elles participent au transport des bactéries pathogènes comme *S. Typhimurium* du tractus intestinal vers les nodules lymphatiques mésentériques. En 2008, le même groupe a mis en évidence que ces cellules induisent la différenciation des lymphocytes T en Th17 et

favorisent la production d'IgA par les cellules B (Uematsu *et al.*, 2008). Le tropisme muqueux des bactéries flagellées pourrait être à l'origine de ce mécanisme immunitaire.

La flagelline présente des effets adjuvants sur divers antigènes et par diverses voies d'administration : systémique par injection intraveineuse ou intrapéritonéale (Bates *et al.*, 2009; McSorley *et al.*, 2002), ou sous-cutanée (Bargieri *et al.*, 2010; Cunningham *et al.*, 2004; Didierlaurent *et al.*, 2004). Par ailleurs, l'effet adjuvant opère efficacement par voie muqueuse (Lee, 2006 ; Pino, 2005;McSorley, 2002;McDonald, 2007;Strindelius, 2004 ; Nempont, 2008). L'activité de la flagelline s'exprime également chez des primates non humains (Honko *et al.*, 2006; Weimer *et al.*, 2009). Il faut noter que des essais cliniques sont en cours pour tester l'innocuité et l'efficacité de protéines de fusions entre la flagelline et des antigènes chez l'Homme.

L'ensemble de ces résultats met en évidence la contribution de TLR5 dans l'immunité et cette thèse s'est attachée à explorer les propriétés immuno-stimulatrices de la flagelline au sein des tissus muqueux.

OBJECTIFS

Ce travail de thèse a eu pour but d'identifier les acteurs moléculaires et cellulaires impliqués dans l'immunité induite par l'interaction de la flagelline et TLR5 au sein des muqueuses respiratoires et digestives. Deux modèles ont été utilisés, un modèle d'administration locale mimant une colonisation microbienne et un modèle invasif simulant l'invasion du compartiment interne des muqueuses par les pathogènes (Figure 15). L'impact de la flagelline sur l'immunité innée et adaptative a ainsi été étudié.

La détection des pathogènes par les PRR comme les TLR est un élément déclencheur des réponses immunitaires. Les travaux précédents du laboratoire et de compétiteurs ont mis en évidence le rôle majeur des cellules épithéliales (radiatorésistantes) dans la mobilisation de la réponse innée suite à une instillation intranasale de flagelline (Didierlaurent *et al.*, 2008; Feuillet *et al.*, 2006). Mon premier objectif a été de faire la preuve de concept que la stimulation locale de TLR5 pouvait protéger d'une infection bactérienne respiratoire et d'en déterminer les mécanismes d'action. Dans ce travail réalisé en collaboration avec le Dr. Chabalgoity (Montevideo, Uruguay), nous avons sélectionné *Streptococcus pneumoniae* comme pathogène modèle. Les infections respiratoires à *S. pneumoniae* sont la 5^e cause de mortalité dans le monde. Elles touchent principalement les jeunes enfants et les personnes âgées. De plus, l'émergence de souches multi-résistantes aux antibiotiques rend les traitements d'attaques peu actifs. L'immunité contre cette bactérie est sous la dépendance de la réponse TLR chez l'Homme. En effet, le groupe du Dr Casanova a mis en évidence que des altérations génétiques dans les gènes *MYD88* et *IRAK4* prédisposent à des pneumonies sévères à *S. pneumoniae* (von Bernuth *et al.*, 2008). La manipulation de la réponse induite par les TLR semblait donc une stratégie innovante pour développer de nouvelles approches thérapeutiques contre une telle infection. Ce travail a fait l'objet de l'article 1 : "Mucosal administration of flagellin protects mice from *Streptococcus pneumoniae* lung infection", accepté pour publication dans *Infection and Immunity*.

Le dogme actuel postule que les cellules présentatrices d'antigènes doivent être directement activées par les agonistes TLR pour initier une réponse adaptative. Aux sites muqueux, la barrière épithéliale compartimente les réponses immunitaires : les cellules présentatrices d'antigènes et les agonistes TLR sont séparés par l'épithélium. L'épithélium arbore à sa surface de nombreux PRR et joue un rôle primordial dans les défenses innées muqueuses dépendantes des TLR. En revanche, son rôle dans l'initiation de l'immunité adaptative muqueuse dépendante des TLR est peu étudié. Mon second objectif a été de définir le rôle des cellules épithéliales broncho-alvéolaires dans l'établissement de l'immunité adaptative de la muqueuse pulmonaire dépendante de la signalisation TLR5. Ce travail fait l'objet de l'article 2 en préparation : "Airway epithelial cells regulate TLR5-mediated mucosal adaptive responses".

Lorsque l'immunité innée n'élimine pas rapidement les bactéries colonisant la muqueuse, les pathogènes invasifs (tels que *S. pneumoniae* et *Yersinia pseudotuberculosis*) pénètrent la barrière épithéliale et envahissent l'hôte. L'organisme doit alors mettre en place de nouveaux mécanismes pour lutter contre l'invasion microbienne. Mon dernier objectif a été d'identifier les réponses développées par la signalisation TLR5 en réponse à une injection systémique de flagelline mimant une invasion microbienne. Ce travail a fait l'objet de l'article 3 : "TLR5 signaling stimulate the innate production of IL-17 and IL-22 by CD3^{neg}CD127⁺ immune cells in spleen and mucosa", publié dans The Journal of Immunology.

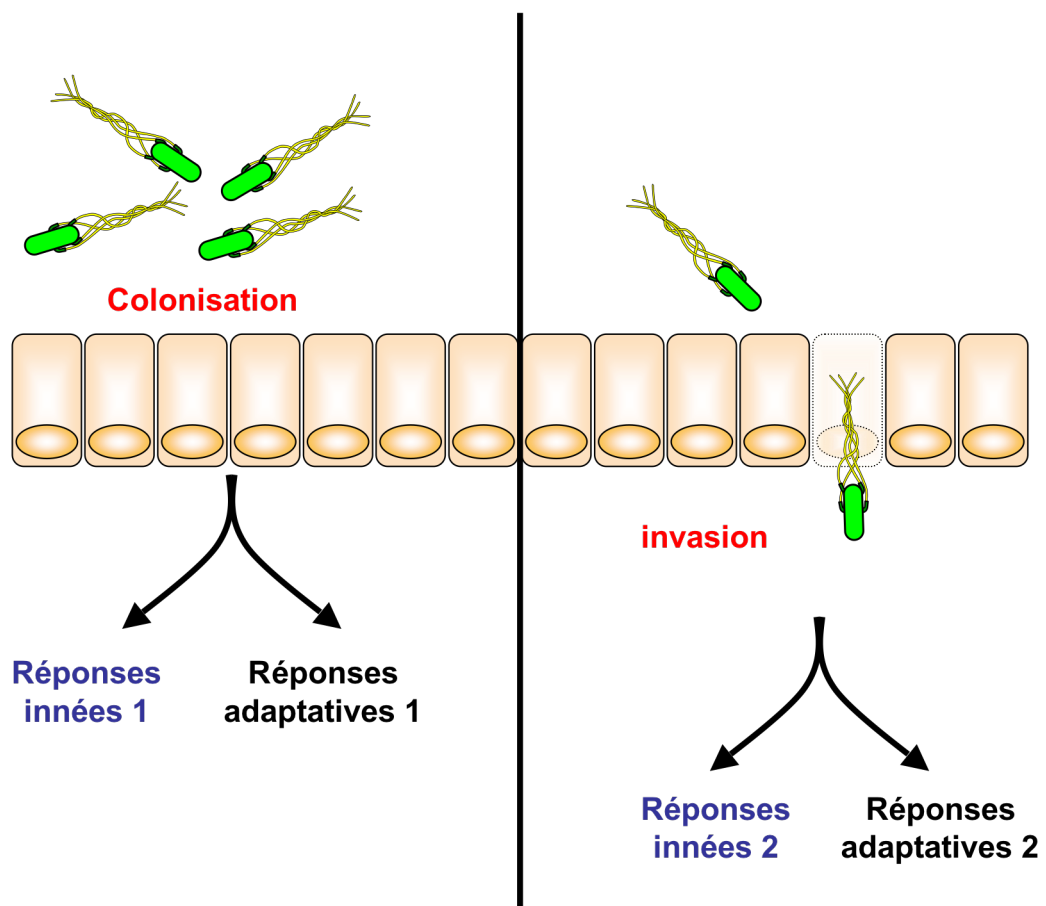


Figure 15 : Schéma récapitulatif des objectifs de la thèse.

Lors d'une infection muqueuse, le pathogène peut coloniser la muqueuse ou envahir le compartiment systémique interne. Pour se défendre, l'organisme met en place des réponses innées et/ou adaptatives spécifiques à chaque condition.

RÉSULTATS

L'administration locale de flagelline induit des réponses immunitaires épithéliales

Article 1

Mucosal administration of flagellin protects mice from *Streptococcus pneumoniae* lung infection.

Muñoz and Van Maele et al., *Infection and Immunity*. 2010

Les infections respiratoires à *Streptococcus pneumoniae* touchent principalement les jeunes enfants et les personnes âgées et causent 5 millions de décès par an. Cette bactérie à Gram positif comprend 91 sérotypes définis par la composition de sa capsule (van der Poll et Opal, 2009). La virulence est intimement associée au sérotype. Certains sérotypes sont retrouvés en portage asymptomatique alors que d'autres vont donner des formes infectieuses graves dites invasives dans lesquelles les bactéries disséminent dans la circulation voir les méninges. Ces derniers sont inclus dans les préparations vaccinales. Cependant, il a été observé que les sérotypes invasifs changent une fois la vaccination généralisée dans une population. De plus, la résistance aux antibiotiques est un problème majeur chez *S. pneumoniae*. Les infections à *S. pneumoniae* représentent donc un problème de Santé public et le développement de nouvelles thérapies est nécessaire. Pour cette étude, nous avons utilisé une souche de sérotype 1 isolée d'une infection invasive chez l'Homme.

Dans un modèle murin d'infection respiratoire aiguë à *S. pneumoniae* de sérotype 1, nous avons observé une prolifération des bactéries dans le tissu pulmonaire associée à une invasion bactérienne rapide de la circulation sanguine et de la rate conduisant à la mort de l'animal. L'activation des défenses innées est essentielle pour contrôler l'infection à *S. pneumoniae* chez la souris de laboratoire et l'Homme (Albiger et al., 2005; Ku et al., 2007; Paterson et Mitchell, 2006; von Bernuth et al., 2008). Il est connu que *S. pneumoniae* exprime divers motifs moléculaires spécifiques de TLR2, TLR4 et TLR9. Puisque la flagelline est capable d'induire des réponses innées épithéliales dépendante de TLR5, elle représente donc un bon candidat de molécule thérapeutique (Feuillet et al., 2006; Janot et al., 2009). L'administration nasale de flagelline de *S. typhimurium* dans un protocole prophylactique ou thérapeutique (tous 2 dans une fenêtre de 24h) ou en co-administration avec *S. pneumoniae* protège l'animal de l'infection et de ses conséquences, i.e. bactériémie et mort. Les poumons des animaux traités avec la flagelline présentent une infiltration cellulaire importante au début de l'infection, mais recouvrent rapidement une architecture normale simultanément à la clairance bactérienne. En utilisant une flagelline mutante, nous avons montré que la signalisation par TLR5 était nécessaire à la protection. La flagelline induit

l'expression pulmonaire de gènes codant des chimiokines impliquées dans le recrutement de neutrophiles comme *Cxcl1*. Cette activation transcriptionnelle présente une intensité plus élevée que celle observée lors de l'instillation de *S. pneumoniae* seul. En utilisant des anticorps déplétants et des souris SCID, nous avons montré que la protection dépend de l'infiltration pulmonaire des neutrophiles, mais qu'elle est indépendante de la présence de lymphocytes T et B ou d'anticorps. En conclusion, cette étude met en évidence qu'une stimulation muqueuse de l'immunité innée par un agoniste TLR non spécifique de l'infection en cours permet d'augmenter l'immunité anti-infectieuse.

Mucosal Administration of Flagellin Protects Mice from *Streptococcus pneumoniae* Lung Infection[▽]

Natalia Muñoz,^{1†} Laurye Van Maele,^{2†} Juan M. Marqués,¹ Analía Rial,¹
Jean-Claude Sirard,² and José A. Chabalgoity^{1*}

Laboratory for Vaccine Research, Department of Biotechnology, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina,
Universidad de la República, Montevideo, Uruguay,¹ and Center for Infection and Immunity of Lille,
Institut Pasteur de Lille, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1019,
CNRS, UMR 8204, and Université Lille Nord de France, Lille, France²

Received 5 March 2010/Returned for modification 14 April 2010/Accepted 13 July 2010

Streptococcus pneumoniae is a major cause of pneumonia in infants and the elderly. Innate defenses are essential to the control of pneumococcal infections, and deficient responses can trigger disease in susceptible individuals. Here we showed that flagellin can locally activate innate immunity and thereby increase the resistance to acute pneumonia. Flagellin mucosal treatment improved *S. pneumoniae* clearance in the lungs and promoted increased survival of infection. In addition, lung architecture was fully restored after the treatment of infected mice, indicating that flagellin allows the reestablishment of steady-state conditions. Using a flagellin mutant that is unable to signal through Toll-like receptor 5 (TLR5), we established that TLR5 signaling is essential for protection. In the respiratory tract, flagellin induced neutrophil infiltration into airways and upregulated the expression of genes coding for interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), CXCL1, CXCL2, and CCL20. Using depleting antibodies, we demonstrated that neutrophils are major effectors of protection. Further, we found that B- and T-cell-deficient SCID mice clear *S. pneumoniae* challenge to the same extent as immunocompetent animals, suggesting that these cell populations are not required for flagellin-induced protection. In conclusion, this study emphasizes that mucosal stimulation of innate immunity by a TLR not naturally engaged by *S. pneumoniae* can increase the potential to cure pneumococcal pneumonia.

Streptococcus pneumoniae (pneumococcus) causes respiratory infections among infants and the elderly worldwide (40, 44). Capsular polysaccharide is the main virulence factor, and its composition defines 91 serotypes of pneumococcus (42). Certain serotypes colonize the human nasopharynx asymptotically, representing a reservoir for interindividual transmission of the bacteria. In some individuals, colonization may progress to pneumococcal pneumonia and invasive disease (19, 36). In contrast, other serotypes, such as serotype 1, are rarely associated with colonization but cause invasive infections (28).

Activation of innate defenses is essential for the control of pneumococcal infection (1, 20). Toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4, and TLR9, as well as the adaptor MyD88, participate in the early detection and clearance of pneumococcus in the lungs (reviewed in reference 42). The cytosolic receptors Nod1 (nucleotide-binding oligomerization domain 1) and Nod2 are also involved in the recognition of pneumococci (29). TLR signaling activates mucosal innate responses that culminate with the recruitment of phagocytes, such as polymorphonuclear neutrophils (PMN) and macrophages, and the production of microbicidal agents (for a review, see reference 8). This process triggers rapid eradication of the pathogen by phagocytosis as

well as by extracellular killing. In MyD88-deficient animals, *S. pneumoniae* is unable to intrinsically trigger any PMN recruitment into the airways, and animals thus have increased susceptibility to pneumonia (1). The contribution of TLR signaling in humans has been highlighted by a recent study showing that some MyD88 polymorphisms are associated with increased susceptibility to pneumococcal infection (43).

The modulation of immunity by the activity of innate receptors to elicit protective responses against infections is an emerging concept (6, 35). The rationale is to promote innate responses that greatly exceed in magnitude, quality, and dynamics the innate response triggered by the pathogen itself. The effectiveness of TLR agonists for therapeutic treatment of infectious diseases has been demonstrated in several animal models, including models of respiratory infections (6, 21, 35). TLR5 senses bacterial flagellins, which are the main constituents of flagella. Various cells of the pulmonary tract, including the epithelial cells (14, 33), express TLR5, and mucosal administration of flagellin induces MyD88-dependent signaling, characterized by the swift production of various proinflammatory cytokines and chemokines (3, 10, 15, 16, 27, 33), as well as by rapid and heavy neutrophil infiltration into the airways (2, 10, 16). Although *S. pneumoniae* does not have flagella, we hypothesized that activation of TLR5 signaling may promote new and appropriate protective innate defenses against ongoing acute pneumococcal infections. Here we report that local stimulation of innate immunity by flagellin from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium blocks the progression of pneumococcal pneumonia in mice.

* Corresponding author. Mailing address: Department of Biotechnology, Laboratory for Vaccine Research, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo 11600, Uruguay. Phone: (598 2) 487 12 88, ext. 1120. Fax: (598 2) 487 30 73. E-mail: jachabal@higiene.edu.uy.

† N.M. and L.V.M. contributed equally to the present work.

▽ Published ahead of print on 19 July 2010.

TABLE 1. Sequences of primers used for qRT-PCR

Gene name	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (5'–3')	Product length (bp)
<i>Actb</i>	GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT	CGTCATCCATGGCGAACTG	68
<i>Cxcl1</i>	CTTGGTTTCAGAAAATTGTCCAAA	ACGGTGCCATCAGAGCAGTCT	84
<i>Cxcl2</i>	CCCTCAACGGAAGAACCAAA	CACATCAGGTACGATCCAGGC	72
<i>Ccl20</i>	TTTTGGGATGGAATTGGACAC	TGCAGGTGAAGCCTTCAACC	69
<i>Il4</i>	ACAGGAGAAGGGACGCCAT	GAAGCCCTACAGACGAGCTCA	95
<i>Il6</i>	GTTCTCTGGGAAATCGTGGAAA	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA	78
<i>Il17a</i>	CTCCAGAAGGCCCTCAGACTAC	GGGTCTTCATTGCGGTGG	69
<i>Il17f</i>	CCCATGGGATTACAACATCACTC	CCTGGGCCCTCAGCGATC	66
<i>Il23a</i>	GCCCCGTATCCAGTGTGAAG	CGGATCCTTTGCAAGCAGAA	78
<i>Tgfb1</i>	GCTGAACCAAGGAGACGGAAT	GAGTTTGTATCTTTGCTGTCACAAGA	76
<i>Tnf</i>	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA	CCTCCACTTGGTGGTTTGCT	63

MATERIALS AND METHODS

Bacterial preparation. *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 (clinical isolate E1586) was obtained from the National Reference Laboratory, Ministry of Health, Montevideo, Uruguay (39). Working stocks were prepared as follows. Todd-Hewitt yeast broth (THYB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was inoculated with fresh colonies of *S. pneumoniae* grown on blood agar plates, and the culture was incubated at 37°C until it reached an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.7 to 0.9. Cultures were stored at –80°C in THYB plus 12% (vol/vol) glycerol for as long as 3 months. For mouse infection, working stocks were thawed, washed with sterile physiological saline solution (saline), and diluted to the appropriate concentration. The number of bacteria in stocks was confirmed by plating serial dilutions onto blood agar plates.

Proteins. Native flagellin (FliC) from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SIN22 and recombinant flagellin mutants (FliC_{Δ174–400} and FliC_{Δ174–400/89–96*}) were prepared as described previously (27). Both mutants lack the hypervariable domain of flagellin, and FliC_{Δ174–400/89–96*} also carries a further amino acid substitution (amino acids [aa] 89 to 96) that prevents TLR5 signaling (27). All proteins contained low levels of lipopolysaccharide (LPS) (less than 30 pg LPS per µg, as determined with the *Limulus* assay). In some experiments, trypsin-hydrolyzed FliC (FliC/T) was used as a control. Native FliC was heated for 5 min at 65°C before use to ensure that the proteins were mostly monomers. The dose of flagellin used was 1 µg for all the experiments, since we and others have previously shown that administration of this dose by the intranasal (i.n.) route is optimal for eliciting strong local immune activation (15, 16). Further, unless otherwise specified, FliC, FliC/T, FliC_{Δ174–400}, or FliC_{Δ174–400/89–96*} was always coadministered i.n. with the *S. pneumoniae* suspension. To exclude any direct effect of flagellin on bacterial viability, viable counts were determined prior to and after the incubation of *S. pneumoniae* with the same concentration of flagellin used for the *in vivo* assay. There were no significant differences between the number of bacteria recovered after incubation with flagellin and that recovered under the control condition.

Animal infections. Female mice of the BALB/c, C57BL/6J, and outbred NMRI strains (6 to 8 weeks old) were obtained from the National Division of Veterinary Laboratories (Uruguay) or the Janvier Laboratories (France). Female SCID mice (C.B-17 SCID) were obtained from the Institut Pasteur de Lille breeding facilities. These mice are characterized by the lack of B and T lymphocytes and by agammaglobulinemia. Animals were maintained in individually ventilated cages and were handled in a vertical laminar flow cabinet (class II A2; Esco, Hatboro, PA) for infection. All experiments complied with current national and institutional regulations and ethical guidelines (CHEA [Universidad de la República, Montevideo, Uruguay] and A59107 [Institut Pasteur de Lille]). Mice were anesthetized by intraperitoneal (i.p.) injection of 2.2 mg ketamine (Richmond Vet Pharma, Grand Bourg, Buenos Aires, Argentina) plus 0.11 mg xylazine (Portinco, Montevideo, Uruguay) in a total volume of 200 µl or by inhalation of isoflurane (Belamont, SAS, France) using a non-rebreathing anesthesia system (DRE Compact 150; DRE Veterinary, Louisville, KY). Bacteria and flagellins were administered into the nostrils of mice in 20 to 50 µl of saline. The survival of mice was recorded daily.

For depletion of granulocytes, 100 µg of anti-Gr-1 (RB6-8C5) or an isotype control (HB152) was administered i.p. 24 h before i.n. challenge with *S. pneumoniae* (24). The anti-Gr1 injection was found to deplete 96.8% ± 1.2% of PMN in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid after intranasal flagellin treatment.

Determination of bacterial loads in lungs and spleens. Lungs and spleens were collected at selected time points after intranasal challenge and were homogenized with an Ultra Turrax homogenizer (IKA-Werke, Staufen, Germany).

Viable counts were determined by plating serial dilutions onto blood agar plates.

Quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). Lungs were homogenized in Trizol reagent (Invitrogen, CA) with an Ultra Turrax homogenizer and were stored at –80°C. RNA was extracted according to the manufacturer's instructions. Prior to cDNA synthesis, 1 µg total RNA was treated with DNase I (Invitrogen), and first-strand cDNA synthesis was carried out using random primers (Invitrogen) and Moloney murine leukemia virus (M-MLV) reverse transcriptase (Invitrogen). Real-time PCR was performed using a QuantiTect SYBR green PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany) in a Rotor-Gene 6000 real-time rotary analyzer (Corbett, Sydney, Australia) according to the following protocol: 15 min at 95°C, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. The primers are listed in Table 1 and were used at a final concentration of 0.9 µM. The expression of the gene of interest was normalized by using β-actin as a housekeeping gene. Results are presented as fold increases in mRNA levels over those for the saline-treated group.

Determination of PMN infiltration into the airways and lungs. For BAL sampling, the trachea was cannulated, and 1 ml of phosphate-buffered saline (PBS) plus 1 mM EDTA was instilled six times and recovered by gentle aspiration; this process was repeated twice. Cells were suspended in FACS-EDTA buffer (PBS, 0.1% azide, and 1% bovine serum albumin [Sigma-Aldrich] plus 5 mM EDTA). Lung cells were isolated after collagenase and DNase treatment as previously described (34) and were filtered through a 40-µm-pore-size cell strainer. Immune cells were separated in a two-layer Percoll (Sigma-Aldrich) gradient. Briefly, cells were suspended in 35% isotonic Percoll solution, carefully placed on top of a 70% isotonic Percoll solution, and centrifuged for 30 min at 2,600 × g and room temperature without a brake. The top ring of cells, corresponding mostly to epithelial cells, was discarded, and immune cells were recovered from the ring of cells closest to the 70% Percoll layer. Cells were filtered using a 100-µm-pore-size cell strainer, washed, and stained for fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis. Neutrophils were identified by forward scatter-side scatter (FSC-SSC); by positive staining either for anti-Ly6G (clone 1A8) and anti-Ly6C (clone HK1.4) or for anti-Gr-1 (clone RB68c5), as well as for anti-CD11b (clone M1/70); and by negative staining for anti-CD11c (clone HL3). Antibodies were obtained either from BD Biosciences, from BioLegend (San Diego, CA), or from AbD Serotec (United Kingdom). After fixation with 4% paraformaldehyde (PFA), flow cytometry data were acquired on a FACSCalibur cytometer with CellQuest software (version 3.3; BD Biosciences).

Histological analysis. Lungs were fixed in 4% formalin (Sigma-Aldrich) for 24 h and were then embedded in paraffin. Lung blocks were sectioned at a thickness of 5 µm using a Leica microtome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and were adhered to silanized slides. Three mice per group were analyzed. Six sections from each mouse were stained with hematoxylin and eosin and were analyzed in a double-blind manner by using a Nikon Eclipse 80i microscope and a Nikon DS-Ri1 digital camera. Images were processed using NIS-Elements BR (version 3.0) software (Laboratory Imaging).

Statistical analysis. A log rank (Mantel-Cox) test was performed for analysis of survival curves. For comparison between two groups, the Mann-Whitney test was performed. *P* values of <0.05 were considered significant in all cases. Statistical analysis was carried out using GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA).

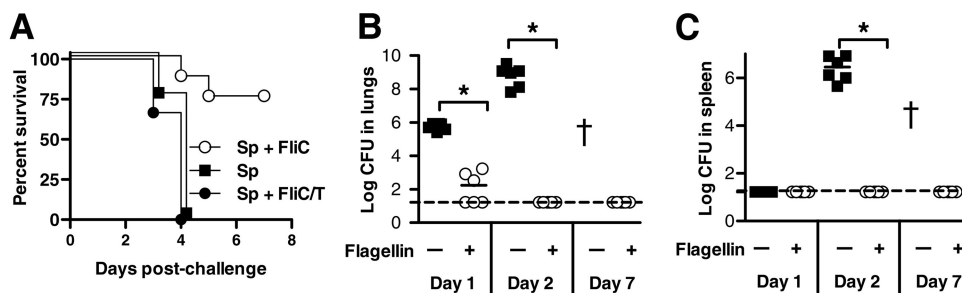


FIG. 1. Flagellin protects BALB/c mice against a lethal respiratory challenge with *S. pneumoniae*. BALB/c mice ($n = 8$) were infected i.n. with 4×10^5 CFU of *S. pneumoniae* (Sp) serotype 1 in saline alone (filled squares) or in saline supplemented either with 1 μ g flagellin (FliC) (open circles) or with 1 μ g trypsin-digested flagellin (FliC/T) (filled circles). (A) The survival of mice was monitored daily. The survival of the FliC-treated group was statistically significantly different from that of the saline group and the FliC/T-treated group. The results are representative of 1 out of 3 experiments. (B and C) CFU counts were determined in the lungs (B) or spleens (C) of mice ($n = 6$) at days 1, 2, and 7 after challenge with *S. pneumoniae* alone (filled squares) or *S. pneumoniae* plus flagellin (open circles). The solid lines represent means, and the dashed lines represent the CFU detection limit. The daggers indicate that all animals in the group were dead by day 7. Significant differences between groups ($P < 0.05$) are indicated by asterisks. Results are representative of 1 out of 2 experiments.

RESULTS

Intranasal delivery of flagellin protects mice against a lethal challenge with *S. pneumoniae*. We first determined the minimal dose of *S. pneumoniae* that causes 100% mortality in BALB/c mice upon intranasal (i.n.) administration. Animals were infected with increasing doses of a clinical isolate of *S. pneumoniae* serotype 1, and survival was assessed daily (data not shown). We defined 4×10^5 CFU as the minimal lethal dose (MLD) that kills all animals within 72 to 120 h.

The capacity of flagellin to control pneumococcal pneumonia was then assessed by comparing the survival of mice challenged intranasally with *S. pneumoniae* to that of mice instilled with flagellin (FliC) and *S. pneumoniae*. As a control, mice were also challenged with *S. pneumoniae* and flagellin that had been hydrolyzed with trypsin previously (FliC/T). As shown in Fig. 1A, FliC-treated mice had a survival rate of 75%, while untreated or FliC/T-treated animals died within 3 to 4 days after challenge. The protection induced by flagellin ranged from 75 to 100% in different independent experiments.

Coadministration of flagellin with *S. pneumoniae* challenge resulted in significant reductions of bacterial counts in the lungs within the first 24 h after challenge compared with those for animals that received *S. pneumoniae* alone. Moreover, bacterial loads in the lungs continued to increase until death in all mice that received no treatment, while in flagellin-treated mice, bacteria were cleared from the lungs by day 2 after infection and could no longer be detected at the local level (Fig. 1B). The capacity of flagellin to protect against systemic infection was also evaluated by assessing bacterial loads in the spleens of treated and untreated mice at different time points after challenge. As shown in Fig. 1C, high numbers of *S. pneumoniae* organisms were detected in the spleens of all untreated animals as early as 48 h after infection. In contrast, bacteria could not be detected in the spleens of flagellin-treated mice at any time point (Fig. 1C).

We also evaluated whether flagellin could exert a protective response against pneumococcal infection when administered before or after the infection. All animals receiving flagellin intranasally 12 to 24 h before pneumococcal challenge survived, while all control mice died by day 4. To assess the

therapeutic value of flagellin administration, BALB/c mice were infected with *S. pneumoniae*, and 24 h later, they either were treated with 1 μ g of flagellin by the i.n. route or remained untreated. The level of protection among animals receiving flagellin ranged from 60 to 100%, while all untreated mice died of infection. As shown in Fig. 2, therapeutic administration of flagellin induced significant reductions of bacterial loads in the lungs (Fig. 2A) as well as in the spleen (Fig. 2B) as detected 48 h after infection (24 h after flagellin administration). By day 7, *S. pneumoniae* was no longer detectable in the lungs or spleens of surviving animals. Therefore, flagellin shows prophylactic as well as therapeutic effects in pneumococcal pneumonia.

The capacity of flagellin to induce protection was also assessed in C57BL/6 mice and in mice of the outbred strain NMRI. The MLD of *S. pneumoniae* serotype 1 was found to be 2×10^6 CFU for both strains, and flagellin-mediated protection was evaluated with $5 \times$ MLD. Administration of flagellin 12 h before bacterial challenge induced 80% protection in C57BL/6 mice; similarly, 100% protection was achieved in

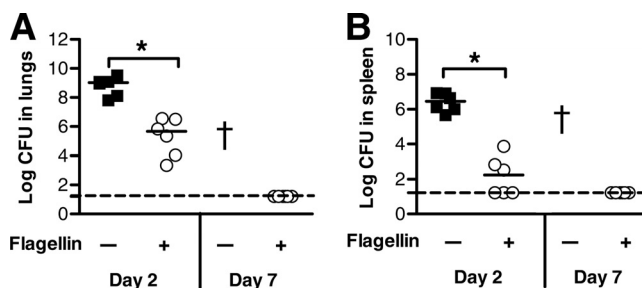


FIG. 2. Therapeutic effect of FliC after *S. pneumoniae* challenge. BALB/c mice were infected intranasally with 4×10^5 CFU of *S. pneumoniae* (filled squares); 24 h after challenge, 1 μ g of FliC was administered i.n. to one group of animals (open circles). CFU counts were determined in the lungs (A) or spleens (B) at day 2 and day 7 after challenge with *S. pneumoniae*. Solid and dashed lines represent means and the CFU detection limit, respectively. The dagger indicates that all animals in the group were dead by day 7. Significant differences between groups ($P < 0.05$) are indicated by asterisks. Results are representative of 1 out of 2 experiments.

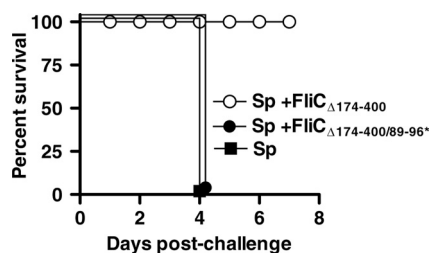


FIG. 3. TLR5 signaling is required for flagellin-mediated protection against *S. pneumoniae* infection. BALB/c mice ($n = 8$) were infected i.n. with 4×10^5 CFU of *S. pneumoniae* (Sp) serotype 1 in saline either alone (filled square) or supplemented either with 1 μ g FliC Δ 174-400 (open circles) or with 1 μ g FliC Δ 174-400/89-96*, lacking the TLR5-signaling motif (filled circle). Survival of mice was recorded daily. The survival of the FliC Δ 174-400-treated group was statistically significantly different from that of the untreated and FliC Δ 174-400/89-96*-treated groups ($P < 0.05$). Results are representative of 1 out of 2 experiments.

NMRI animals when flagellin was administered 32 h to 6 h before challenge. Flagellin was also protective when coadministered with *S. pneumoniae* to mice of the C57BL/6 and NMRI strains, although to a lower extent (40%). Taken together, these results show that flagellin treatment is protective in different mouse strains.

We next addressed whether TLR5 signaling is necessary for the protection elicited by flagellin treatment. For this purpose, we used the recombinant flagellins FliC Δ 174-400 and FliC Δ 174-400/89-96* (27). FliC Δ 174-400 has the same capacity to promote mucosal TLR5 signaling as native flagellin, whereas

FliC Δ 174-400/89-96* carries mutations that prevent TLR5 signaling. While all mice that received FliC Δ 174-400 and *S. pneumoniae* survived the challenge, none of those receiving the mutant FliC Δ 174-400/89-96* did so (Fig. 3). These results strongly suggest that TLR5 signaling is required for protection.

Flagellin treatment promotes proinflammatory gene expression and exacerbates transient cellular infiltration into the lungs during pneumococcal pneumonia. We then analyzed whether flagellin treatment modifies the lungs' transcriptional response to pneumococcal infection. Mice were challenged with *S. pneumoniae* alone or with *S. pneumoniae* plus flagellin as before. Another group received flagellin alone as a control. Twenty-four hours after treatment and infection, lungs were harvested in order to analyze the expression of selected genes by qRT-PCR. Administration of flagellin alone or in combination with *S. pneumoniae* provoked a dramatic increase in *Cxcl1*, *Cxcl2*, and *Ccl20* mRNA levels over those observed with pneumococcal challenge alone (Fig. 4). Flagellin treatment also increased the expression of *Tnf*, although the difference was consistent, it was not statistically significant. Expression of *Il6* was increased in animals that were challenged and treated with flagellin but not in those that received flagellin or *S. pneumoniae* alone, suggesting a synergistic effect of flagellin and pneumococcal infection on *Il6* expression (Fig. 4). Among all groups, mRNA levels of the *Tgfb1*, *Il17a*, *Il17f*, *Il23*, and *Il4* genes remained unchanged from those for mock-treated animals (data not shown).

To assess if the expression of proinflammatory genes correlated with inflammation and cellular infiltration into the airways, we performed histological analysis of lung tissue ob-

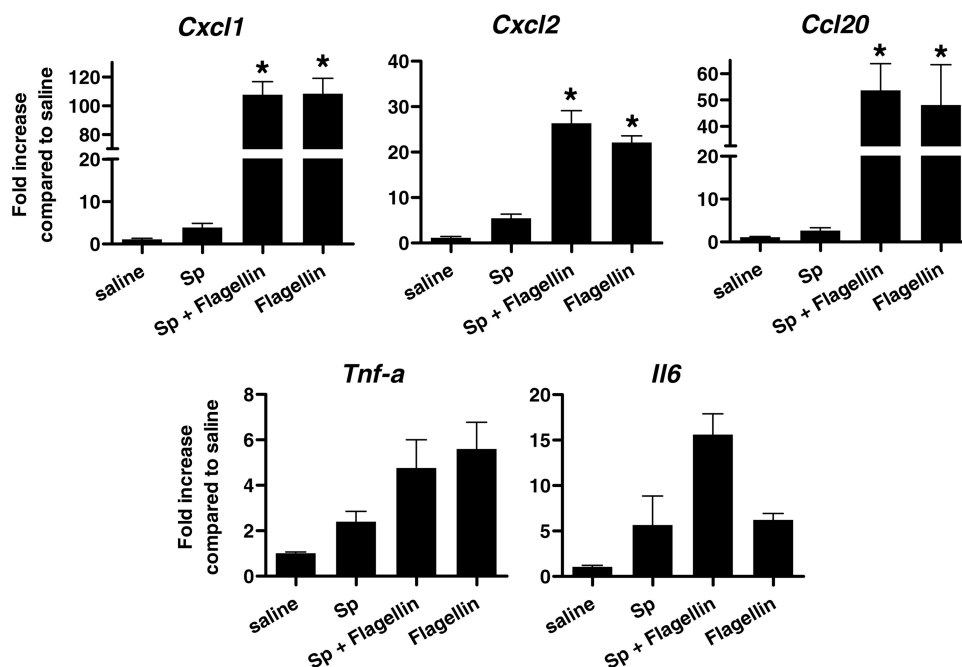


FIG. 4. Flagellin upregulates chemokine and cytokine gene expression in the lungs of infected animals. BALB/c mice ($n = 5$) were instilled i.n. either with saline, with 1 μ g flagellin (FliC), or with 4×10^5 CFU of *S. pneumoniae* (Sp) serotype 1 either in saline alone or in saline supplemented with 1 μ g FliC. Mice were sacrificed 24 h after challenge, and the expression of the *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Ccl20*, *Il6*, and *Tnf* genes was assessed by qRT-PCR on total lung RNA. Values were normalized to that of β -actin mRNA, and the results are expressed relative to mRNA levels in saline-treated mice. Data are means; error bars represent standard errors of the means. Significant differences between groups ($P < 0.05$) are indicated by asterisks. Results are representative of 1 out of 3 experiments.

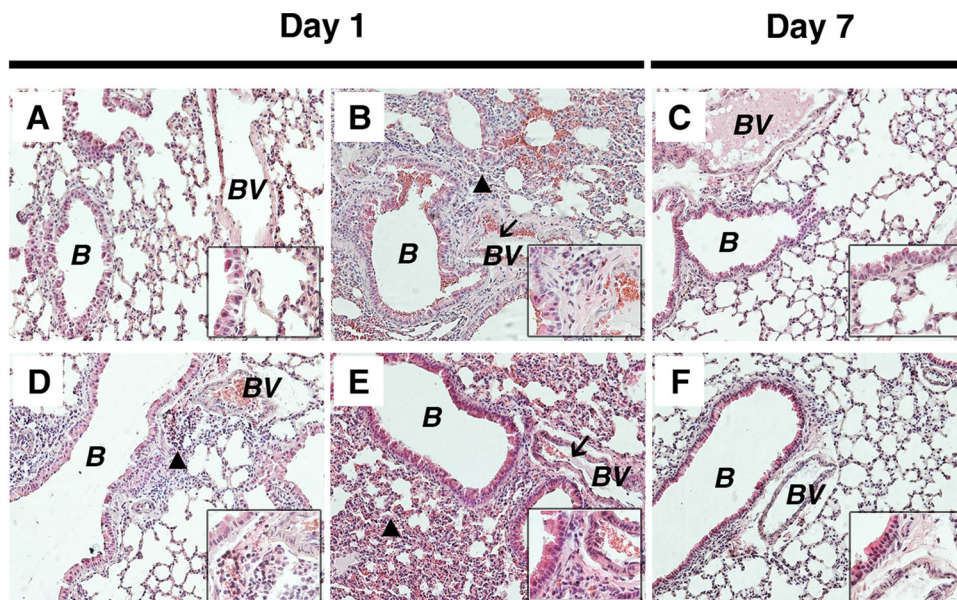


FIG. 5. Flagellin promotes heavy cell infiltration and lung remodeling and induces rapid restoration of tissue architecture. Mouse lungs were obtained at day 1 or day 7 after intranasal instillation of saline (A and F), 4×10^5 CFU of *S. pneumoniae* serotype 1 (D), *S. pneumoniae* plus 1 μ g flagellin (B and C), or flagellin alone (E) and were stained with hematoxylin and eosin. B, bronchiole; BV, blood vessel. Thin arrows indicate edema; arrowheads indicate cellular infiltration. On day 1, edema and recruitment of inflammatory cells were evident in peribronchial and perivascular regions in flagellin-treated animals. Infected but untreated animals showed less inflammatory-cell infiltration and edema at 24 h than flagellin-treated and infected mice. Flagellin-treated animals showed resolution of inflammation by day 7. Total magnification, $\times 200$ for panels and $\times 1,000$ for insets. The images shown are representative of the analysis of 6 sections for each individual and 3 mice per experimental group.

tained 24 h after flagellin treatment and infection. As shown in Fig. 5, *S. pneumoniae* induced moderate cellular infiltration, restricted to certain bronchioles and some perivascular areas close to these bronchioles (Fig. 5D). In contrast, flagellin treatment, alone or together with pneumococci, induced edema, as well as heavy infiltration of cells affecting not only perivascular and peribronchial regions but also some areas of the surrounding lung parenchyma (Fig. 5B and E). Remarkably, at day 7, lungs from mice that had received flagellin and pneumococci showed complete resolution of the inflammation, with no apparent cellular infiltration or edema (Fig. 5C). These results suggest that flagellin induces a strong but transient inflammatory response that promotes the clearance of bacteria without causing any permanent alteration of lung morphology or function.

Flagellin-induced protection requires Gr-1-expressing cells but is independent of B and T lymphocytes. Recruitment of neutrophils into the airways is a hallmark of both pneumococcal infection and nasal flagellin treatment (15, 18), and here we showed that flagellin treatment and infection activated the expression of genes involved in neutrophil recruitment (Fig. 4). Thus, we aimed at comparing the kinetics of neutrophil infiltration in animals challenged with *S. pneumoniae* and either left untreated or treated with flagellin. BAL specimens were collected at different time points after challenge and were stained with anti-Gr-1, anti-CD11b, and anti-CD11c antibodies. As shown in Fig. 6A, pneumococcal challenge induced the recruitment of PMN in all animals. However, mice treated with flagellin at the time of the challenge showed a more rapid and pronounced infiltration of PMN into the airways than mice challenged with *S. pneumoniae* alone. At 24 h, PMN infiltration

peaked in both groups, and the difference between groups was maximal. However, by 48 h, the numbers of PMN were no longer significantly different between groups. Thus, coadministration of flagellin with pneumococci promoted a rapid and transient recruitment of a high number of neutrophils into the airways.

Subsequently, we determined whether neutrophils were critical for flagellin-mediated protection in the coadministration setting of flagellin treatment. For this purpose, animals were injected i.p. with a monoclonal antibody specific for granulocyte receptor-1 (Gr-1, or Ly6G/Ly6C) or an isotype control antibody 24 h before challenge alone or challenge plus treatment. Animals that received the isotype control and were treated with FliC survived the challenge (Fig. 6B). In contrast, anti-Gr-1 treatment depleted $>95\%$ of neutrophils from the airways and abrogated flagellin-mediated protection against *S. pneumoniae*. These results showed that Gr-1-expressing cells, likely PMN, are critical effectors of flagellin-induced protection in pneumococcal infection.

Because the protection induced by coadministration of flagellin relied on a rapid influx of PMN into the lungs, we also analyzed the kinetics of PMN recruitment when flagellin was administered after the establishment of the infection. Animals were infected with *S. pneumoniae* and 24 h later either were treated with flagellin or remained untreated. BAL samples were collected at days 2, 3, and 7 after infection and were used for FACS analysis. Like coadministration of flagellin with the challenge, therapeutic administration of flagellin also induced a peak of PMN infiltration at 24 h after flagellin instillation, which decreased rapidly afterwards. By day 7, no neutrophils were detected in the lungs of animals treated with flagellin

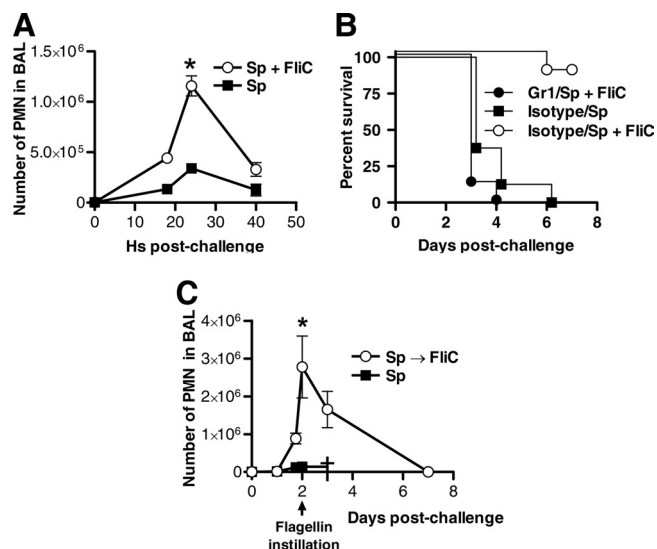


FIG. 6. Flagellin-mediated neutrophil recruitment is required for protection against pneumonia. (A) Kinetics of PMN infiltration. BALB/c mice ($n = 3$) were infected i.n. with 4×10^5 CFU of *S. pneumoniae* (Sp) serotype 1 in saline alone (filled squares) or in saline supplemented with $1 \mu\text{g}$ flagellin (FliC) (open circles). Animals were sacrificed at the indicated time points after challenge. The total number of cells in bronchoalveolar lavage fluid was determined, and the number of neutrophils (defined as $\text{Ly6C}^+ \text{Ly6G}^+ \text{CD11b}^+$ cells) was determined by flow cytometry. (B) Depletion of PMN abrogates FliC-mediated protection. BALB/c mice ($n = 6$) were injected with $100 \mu\text{g}$ of an anti-Gr-1 monoclonal antibody or a control antibody. Animals were infected i.n. 24 h later with 4×10^5 CFU of *S. pneumoniae* serotype 1 in saline alone (squares) or in saline supplemented with $1 \mu\text{g}$ flagellin (FliC) (circles). Survival was recorded daily. The survival of the nondepleted FliC-treated group was statistically significantly different from that of depleted FliC-treated animals or nondepleted untreated animals ($P < 0.05$). (C) BALB/c mice were infected intranasally with 4×10^5 CFU of *S. pneumoniae* (filled square); 24 h after challenge, $1 \mu\text{g}$ of FliC was administered i.n. to one group of animals (open circles). At selected time points after infection (days 1, 2, and 7), BAL was carried out for 3 mice per time point in order to perform FACS analysis. The total number of cells in BAL fluid was determined, and the number of neutrophils was determined by flow cytometry. The dagger marks the time point at which all animals in the group were dead. For panels A and C, data are means; error bars represent the standard errors of the means; and significant differences between groups ($P < 0.05$) are indicated by asterisks. The results are representative of 1 out of 2 experiments.

(Fig. 6C). Overall, these results suggest that the mechanism behind flagellin-induced protection in the therapeutic setting is similar to that observed when flagellin was coadministered with the bacterial challenge.

Since B and T lymphocytes are involved in the early phase of pneumococcal infection (12, 17, 18), we evaluated their roles in flagellin-induced protection. SCID mice (deficient in antibodies, B cells, and T cells) as well as immunocompetent BALB/c mice were challenged with 2×10^7 CFU of *S. pneumoniae* either alone or with flagellin. Lungs and spleens were collected 36 h after infection for the determination of bacterial counts. As shown in Fig. 7A, flagellin coadministration promoted the clearance of bacteria in the lungs of SCID mice to an extent similar to that in BALB/c mice. Both SCID and BALB/c mice also showed lower bacterial counts in the spleen upon flagellin treatment (Fig. 7B), demonstrating that they were able to

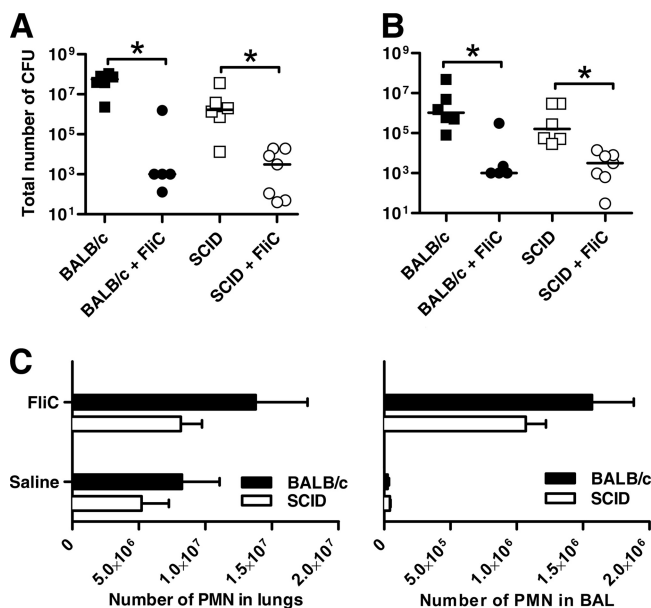


FIG. 7. Flagellin-mediated protection against pneumonia does not depend on B and T lymphocytes. (A and B) BALB/c (solid symbols) or SCID (open symbols) mice ($n = 6$) were infected i.n. with 2×10^7 CFU of *S. pneumoniae* serotype 1 in saline alone (squares) or in saline supplemented with $1 \mu\text{g}$ flagellin (FliC) (circles). Bacterial counts were determined in lung (A) and spleen (B) homogenates 36 h after challenge. Significant differences between groups ($P < 0.05$) are indicated by asterisks. Results are representative of 2 experiments. (C) Recruitment of PMN (defined as $\text{Ly6G}^+ \text{Ly6C}^+ \text{CD11b}^+ \text{CD11c}^-$ cells) into BAL fluid and lungs after i.n. instillation of $1 \mu\text{g}$ flagellin for SCID (open bars) or BALB/c (filled bars) mice ($n = 5$). Note that the numbers of PMN recruited in the two strains were not statistically significantly different. The results are presented as medians and standard errors of the means.

control not only local but also systemic infection. SCID mice recruited similar numbers of PMN into the lungs and alveolar spaces as BALB/c mice 16 h after the instillation of flagellin (Fig. 7C). In summary, these results show that Gr-1-expressing cells require neither B cells nor T lymphocytes in order to trigger flagellin-induced protection.

DISCUSSION

Innate immunity is essential for controlling pneumococcal infection, as shown by the requirements for TLR and MyD88 to prevent early colonization of the respiratory tract by *S. pneumoniae* (1, 20). The immune response to pneumococcal airway infection is characterized by a pronounced, brisk recruitment of neutrophils into the lungs (18), and phagocytic killing of pneumococci by PMN is considered a major defense mechanism. Nevertheless, *S. pneumoniae* can evade the host's innate defenses by inhibiting or delaying complement deposition and the respiratory burst of phagocytes (31). Hence, the neutrophil influx is often ineffective at clearing the infection until serotype-specific antibodies are produced and bypass the inhibition of complement deposition, enhancing opsonophagocytosis. In this study we assessed whether exogenous administration of an agonist of a TLR not naturally engaged by *S. pneumoniae*, namely, the TLR5 agonist flagellin, could

strength innate immunity, enabling it to control an acute respiratory pneumococcal infection. We found that local administration of flagellin promoted the survival of mice challenged with a lethal dose of *S. pneumoniae* serotype 1 by enhancing local and systemic bacterial clearance. Flagellin treatment was effective when performed before, during, or after infection establishment in BALB/c, C57BL/6, and NMRI mice.

It has been demonstrated that *in vivo* administration of flagellin upregulates the expression of proinflammatory cytokines (10, 15, 16, 37, 38). Here we show that coadministration of flagellin at the time of *S. pneumoniae* challenge also upregulates the expression of the PMN-specific chemokine/activator genes *Cxcl1* and *Cxcl2*, as well as *Tnf* and *Ccl20*, in the lungs, whereas *S. pneumoniae* alone induces these genes poorly. In agreement with the chemokine and cytokine expression profile, analysis of lung tissue sections showed a heavy infiltration of cells into the peribronchial and perivascular regions that was more pronounced in the lungs of flagellin-treated animals than in those of infected and untreated animals. Of note, despite the pronounced inflammatory response induced by flagellin, lung tissue recovered fully by day 7, while untreated animals died of infection. The analysis of BAL samples suggested that administration of the TLR5 agonist at the time of pneumococcal challenge as well as after the establishment of infection induced accelerated and more-pronounced PMN recruitment. PMN infiltration was transient and peaked at 24 h after flagellin treatment, after which time it started to decrease. Depletion of Gr-1-expressing cells, most likely PMN, abolished the protection, demonstrating that these cells are necessary for controlling pneumococcal lung infections. The self-limiting nature of the flagellin-mediated inflammatory response is a very relevant finding, since exacerbated inflammation could be associated with failure of the lung barrier and function. The molecular mechanisms controlling TLR5 response not only upregulate proinflammatory genes but also trigger response termination. Therefore, mucosal treatment with flagellin could be considered as a therapy against pneumococcal pneumonia, enhancing neutrophil infiltration and concurrently limiting inflammation, that merits further evaluation in clinical trials.

Besides PMN, several studies have also reported that T and B lymphocytes, as well as natural antibodies, may play important roles in the early control of pneumococcal pneumonia. Kadioglu et al. showed that T lymphocytes accumulate in zones of peribronchial inflammation at early stages of the immune response and are involved in the defense against pneumococci, since major histocompatibility complex (MHC) class II-deficient mice lacking CD4⁺ T cells are more susceptible to infection than their wild-type counterparts (17, 18). Haas et al. showed that CD19-deficient mice, which have impaired development of B1a cells and impaired natural antibody production, have increased susceptibility to pneumococcal infection (12). However, as indicated by the results obtained in SCID mice, neither T nor B cells are required for flagellin-induced local and systemic clearance of bacteria. Taken together, our results strongly suggest that changing the PMN dynamic results in effective killing of pneumococci, even in the absence of B and T lymphocytes.

Our results also showed that TLR5 signaling is required for the protection induced by flagellin. In the airways, TLR5 is expressed by alveolar macrophages (30) and epithelial cells

(16, 32, 33), suggesting that these resident cells may be key players in the induction of protective innate defenses against *S. pneumoniae* upon flagellin treatment. In line with this, recent studies have suggested that the airway epithelium is the TLR5-activated tissue involved in chemokine production and PMN recruitment in response to flagellated bacteria (10, 16). On the other hand, murine neutrophils express TLR5 (13, 45); thus, TLR5 signaling may also activate PMN directly and enhance their *S. pneumoniae* killing capacity. Similarly, Lysenko et al. established that heat-killed *Haemophilus influenzae* can specifically increase the capacity of PMN to kill pneumococci in a Nod1-dependent manner (22, 23). Based on this information and our own results, we can postulate that the mechanism behind the early PMN recruitment and protection induced by flagellin most likely depends on soluble mediators produced by nonhematopoietic cells, likely chemokines produced by epithelial cells, and is independent of antibodies as well as of T and B cells.

Besides the TLR5 signaling activity, it has been shown recently that flagellin can also engage the cytoplasmic sensor IPAF/NLRC4 (11, 25, 26). However, since the mutant flagellin used here is unable to signal through TLR5 but still harbors the motif involved in IPAF/NLRC4 signaling (26), we can speculate that this pathway does not make a major contribution to the protective effect induced by flagellin treatment.

Current therapies for the prophylaxis and treatment of *S. pneumoniae* infection have limitations in preventing or curing pneumococcal disease (reviewed in references 4, 19, and 41); thus, new strategies of immune intervention are still required. Several reports (5, 7, 9) have shown that the administration of bacterial lysates and whole heat-killed bacteria stimulates protective responses against infection. However, the undefined nature of these preparations is usually a problem when designing drugs for human use. Our results showed that local stimulation with a single and well-characterized molecule, specifically flagellin, is sufficient for augmenting lung innate immune defenses and controlling pneumococcal pneumonia, highlighting the benefits of using microbe-associated molecular patterns as the basis for developing antimicrobial therapies.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the European Community (STREP grant SavinMucoPath INCO-CT-2006-032296) and ECOS-Sud (U08S02). N. Muñoz and A. Rial were funded by ANII and PEDECIBA, School of Chemistry. L. Van Maele and J. C. Sirard were funded by INSERM, the Institut Pasteur de Lille, and the Région Nord Pas-de-Calais (ARCir Europe and Bourse INSERM-Région).

We thank Teresa Camou for kindly providing the *S. pneumoniae* strain.

REFERENCES

1. Albiger, B., A. Sandgren, H. Katsuragi, U. Meyer-Hoffert, K. Beiter, F. Wartha, M. Hornef, S. Normark, and B. H. Normark. 2005. Myeloid differentiation factor 88-dependent signalling controls bacterial growth during colonization and systemic pneumococcal disease in mice. *Cell. Microbiol.* 7:1603–1615.
2. Andersen-Nissen, E., T. R. Hawn, K. D. Smith, A. Nachman, A. E. Lampano, S. Uematsu, S. Akira, and A. Aderem. 2007. Tlr5^{-/-} mice are more susceptible to *Escherichia coli* urinary tract infection. *J. Immunol.* 178:4717–4720.
3. Balloy, V., A. Verma, S. Kuravi, M. Si-Tahar, M. Chignard, and R. Ramphal. 2007. The role of flagellin versus motility in acute lung disease caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Dis.* 196:289–296.
4. Beall, B. 2007. Vaccination with the pneumococcal 7-valent conjugate: a successful experiment but the species is adapting. *Expert Rev. Vaccines* 6:297–301.

5. Ben-David, I., S. E. Price, D. M. Bortz, C. F. Greineder, S. E. Cohen, A. L. Bauer, T. L. Jackson, and J. G. Younger. 2005. Dynamics of intrapulmonary bacterial growth in a murine model of repeated microaspiration. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **33**:476–482.
6. Brown, K. L., C. Cosseau, J. L. Gardy, and R. E. Hancock. 2007. Complexities of targeting innate immunity to treat infection. *Trends Immunol.* **28**: 260–266.
7. Clement, C. G., S. E. Evans, C. M. Evans, D. Hawke, R. Kobayashi, P. R. Reynolds, S. J. Moghaddam, B. L. Scott, E. Melicoff, R. Adachi, B. F. Dickey, and M. J. Tuvim. 2008. Stimulation of lung innate immunity protects against lethal pneumococcal pneumonia in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **177**:1322–1330.
8. Craig, A., J. Mai, S. Cai, and S. Jeyaseelan. 2009. Neutrophil recruitment to the lungs during bacterial pneumonia. *Infect. Immun.* **77**:568–575.
9. Empey, K. M., M. Hollifield, and B. A. Garvy. 2007. Exogenous heat-killed *Escherichia coli* improves alveolar macrophage activity and reduces *Pneumocystis carinii* lung burden in infant mice. *Infect. Immun.* **75**:3382–3393.
10. Feuillet, V., S. Medjane, I. Mondor, O. Demaria, P. P. Pagni, J. E. Galán, R. A. Flavell, and L. Alexopoulou. 2006. Involvement of Toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:12487–12492.
11. Franchi, L., A. Amer, M. Body-Malapel, T. D. Kanneganti, N. Ozoren, R. Jagirdar, N. Inohara, P. Vandenabeele, J. Bertin, A. Coyle, E. P. Grant, and G. Nunez. 2006. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1 β in salmonella-infected macrophages. *Nat. Immunol.* **7**:576–582.
12. Haas, K. M., J. C. Poe, D. A. Steeber, and T. F. Tedder. 2005. B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity* **23**:7–18.
13. Hayashi, F., T. K. Means, and A. D. Luster. 2003. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* **102**:2660–2669.
14. 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.
15. Honko, A. N., and S. B. Mizel. 2004. Mucosal administration of flagellin induces innate immunity in the mouse lung. *Infect. Immun.* **72**:6676–6679.
16. Janot, L., J. C. Sirard, T. Secher, N. Noulain, L. Fick, S. Akira, S. Uematsu, A. Didierlaurent, T. Hussell, B. Ryffel, and F. Erard. 2009. Radioresistant cells expressing TLR5 control the respiratory epithelium's innate immune responses to flagellin. *Eur. J. Immunol.* **39**:1587–1596.
17. Kadioglu, A., W. Coward, M. J. Colston, C. R. Hewitt, and P. W. Andrew. 2004. CD4-T-lymphocyte interactions with pneumolysin and pneumococci suggest a crucial protective role in the host response to pneumococcal infection. *Infect. Immun.* **72**:2689–2697.
18. Kadioglu, A., N. A. Gingles, K. Grattan, A. Kerr, T. J. Mitchell, and P. W. Andrew. 2000. Host cellular immune response to pneumococcal lung infection in mice. *Infect. Immun.* **68**:492–501.
19. Käyhty, H., K. Auranen, H. Nohynek, R. Dagan, and H. Makela. 2006. Nasopharyngeal colonization: a target for pneumococcal vaccination. *Expert Rev. Vaccines* **5**:651–667.
20. Khan, A. Q., Q. Chen, Z.-Q. Wu, J. C. Paton, and C. M. Snapper. 2005. Both innate immunity and type 1 humoral immunity to *Streptococcus pneumoniae* are mediated by MyD88 but differ in their relative levels of dependence on Toll-like receptor 2. *Infect. Immun.* **73**:298–307.
21. Lembo, A., M. Pelletier, R. Iyer, M. Timko, J. C. Dudda, T. E. West, C. B. Wilson, A. M. Hajjar, and S. J. Skerrett. 2008. Administration of a synthetic TLR4 agonist protects mice from pneumonic tularemia. *J. Immunol.* **180**: 7574–7581.
22. Lysenko, E. S., T. B. Clarke, M. Shchepetov, A. J. Ratner, D. I. Roper, C. G. Dowson, and J. N. Weiser. 2007. Nod1 signaling overcomes resistance of *S. pneumoniae* to opsonophagocytic killing. *PLoS Pathog.* **3**:e118.
23. Lysenko, E. S., A. J. Ratner, A. L. Nelson, and J. N. Weiser. 2005. The role of innate immune responses in the outcome of interspecies competition for colonization of mucosal surfaces. *PLoS Pathog.* **1**:e1.
24. Marks, M., T. Burns, M. Abadi, B. Seyoum, J. Thornton, E. Tuomanen, and L.-A. Pirofski. 2007. Influence of neutropenia on the course of serotype 8 pneumococcal pneumonia in mice. *Infect. Immun.* **75**:1586–1597.
25. Miao, E. A., C. M. Alpuche-Aranda, M. Dors, A. E. Clark, M. W. Bader, S. I. Miller, and A. Aderem. 2006. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1 β via Ipaf. *Nat. Immunol.* **7**:569–575.
26. Miao, E. A., D. P. Mao, N. Yudkovsky, R. Bonneau, C. G. Lorang, S. E. Warren, I. A. Leaf, and A. Aderem. 2010. Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**:3076–3080.
27. Nemport, C., D. Cayet, M. Rumbo, C. Bompard, V. Villeret, and J. C. Sirard. 2008. Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity. *J. Immunol.* **181**:2036–2043.
28. Normark, B. H., and S. Normark. 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. *J. Intern. Med.* **252**:91–106.
29. Opitz, B., A. Puschel, B. Schmeck, A. C. Hocke, S. Rosseau, S. Hammerschmidt, R. R. Schumann, N. Suttrop, and S. Hippenstiel. 2004. Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **279**:36426–36432.
30. Oshikawa, K., and Y. Sugiyama. 2003. Gene expression of Toll-like receptors and associated molecules induced by inflammatory stimuli in the primary alveolar macrophage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **305**:649–655.
31. Perry, F. E., C. J. Elson, T. J. Mitchell, P. W. Andrew, and J. R. Catterall. 1994. Characterisation of an oxidative response inhibitor produced by *Streptococcus pneumoniae*. *Thorax* **49**:676–683.
32. Prince, A. 2006. Flagellar activation of epithelial signaling. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **34**:548–551.
33. Ramos, H. C., M. Rumbo, and J. C. Sirard. 2004. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol.* **12**:509–517.
34. Rial, A., D. Lens, L. Betancor, H. Benkiel, J. S. Silva, and J. A. Chabalgoity. 2004. Intranasal immunization with a colloid-formulated bacterial extract induces an acute inflammatory response in the lungs and elicits specific immune responses. *Infect. Immun.* **72**:2679–2688.
35. Romagne, F. 2007. Current and future drugs targeting one class of innate immunity receptors: the Toll-like receptors. *Drug Discov. Today* **12**:80–87.
36. Salyers, A. A., and D. D. Whitt. 2002. Bacterial pathogenesis: a molecular approach, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.
37. Sha, Q., A. Q. Truong-Tran, J. R. Plitt, L. A. Beck, and R. P. Schleimer. 2004. Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **31**:358–364.
38. Sierro, F., B. Dubois, A. Coste, D. Kaiserlian, J. P. Kraehenbuhl, and J. C. Sirard. 2001. Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**:13722–13727.
39. Tomasz, A., A. Corso, E. P. Severina, G. Echániz-Aviles, M. C. Brandileone, T. Camou, E. Castaneda, O. Figueroa, A. Rossi, and J. L. Di Fabio. 1998. Molecular epidemiologic characterization of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* invasive pediatric isolates recovered in six Latin-American countries: an overview. PAHO/Rockefeller University Workshop. Pan American Health Organization. *Microb. Drug Resist.* **4**:195–207.
40. U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Institute of Allergy and Infectious Diseases. May 2007. The Jordan report: accelerated development of vaccines 2007. NIH publication 06-6057. <http://www.niaid.nih.gov/about/organization/dmid/Documents/jordan2007.pdf>.
41. Van Bambeke, F., R. R. Reinert, P. C. Appelbaum, P. M. Tulkens, and W. E. Peetermans. 2007. Multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* infections: current and future therapeutic options. *Drugs* **67**:2355–2382.
42. van der Poll, T., and S. M. Opal. 2009. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* **374**:1543–1556.
43. von Bernuth, H., C. Picard, Z. Jin, R. Pankla, H. Xiao, C. L. Ku, M. Chrabieh, I. B. Mustapha, P. Ghandil, Y. Camcioglu, J. Vasconcelos, N. Sirvent, M. Guedes, A. B. Vitor, M. J. Herrero-Mata, J. I. Arostegui, C. Rodrigo, L. Alsina, E. Ruiz-Ortiz, M. Juan, C. Fortuny, J. Yague, J. Anton, M. Pascal, H. H. Chang, L. Janniere, Y. Rose, B. Z. Garty, H. Chapel, A. Issekutz, L. Marodi, C. Rodriguez-Gallego, J. Banchereau, L. Abel, X. Li, D. Chaussabel, A. Puel, and J. L. Casanova. 2008. Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science* **321**:691–696.
44. WHO. 2007. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization—WHO position paper. *Wkly. Epidemiol. Rec.* **82**:93–104.
45. Zhang, X., L. Majlessi, E. Deriaud, C. Leclerc, and R. Lo-Man. 2009. Co-activation of Syk kinase and MyD88 adaptor protein pathways by bacteria promotes regulatory properties of neutrophils. *Immunity* **31**:761–771.

Article 2

Airway epithelial cells regulate TLR5-mediated mucosal adaptive responses.

Van Maele et al., article en préparation.

Les agonistes TLR représentent d'excellents candidats adjuvants à la fois naturels et quasi-universels. Ils sont à l'origine de la réponse immunitaire contre de nombreux pathogènes. En effet, la signalisation via les TLR stimule l'immunité innée et adaptative : elle induit non seulement la production de cytokines pro-inflammatoires et molécules anti-microbiennes, mais également l'activation des cellules T et B spécifiques d'antigènes. L'activité adjuvante des TLR a principalement été étudiée dans les cellules immunitaires. Parmi les hypothèses évoquées pour définir les mécanismes adjuvants des TLRs sur la réponse adaptative, l'activation directe des CPA représente de loin celle qui est privilégiée (Joffre *et al.*, 2009). En effet, les CPA professionnelles les plus efficaces pour activer les lymphocytes T et B naïfs, à l'origine de la réponse adaptative sont les cellules dendritiques.

Au niveau des muqueuses, la barrière épithéliale compartimente les pathogènes et par conséquent les agonistes de TLR, dans la lumière du moins dans les phases précoces d'interaction. De plus, il est admis que l'immunité muqueuse est compartimentée : une réponse locale nécessite une administration par voie muqueuse des stimuli microbiens et antigéniques. Dans le cas des muqueuses, l'activation directe des CPA par les agonistes TLR est peu probable, car l'antigène est séparé du compartiment systémique par la barrière épithéliale (Figure 7). Les CPA intra-épithéliales sont les seules à même de répondre directement à une stimulation TLR. Par ailleurs, les cellules épithéliales représentent les premières sentinelles à faire face à l'agression microbienne (Fritz *et al.*, 2008). Au contact des agonistes TLR, les cellules épithéliales activent une réponse pro-inflammatoire et la production de molécules anti-microbiennes, et participent ainsi directement à la défense innée des muqueuses (Abreu, 2010).

Le but de cette étude a été de déterminer si l'immunité adaptative des muqueuses dépendait d'une compartimentation de la signalisation TLR (Figure 16). Pour cela, nous avons utilisé la flagelline, agoniste de TLR5 qui induit une réponse muqueuse pulmonaire après une instillation par voie intranasale. Les capacités immuno-stimulatrices ou adjuvantes de la flagelline lui permettent d'augmenter la réponse immunitaire contre des antigènes variés (Le Moigne *et al.*, 2008; McDonald *et al.*, 2007; Salman *et al.*, 2009). En utilisant des souris chimères pour TLR5, nous avons mis en évidence la contribution des cellules radorésistantes du poumon dans l'effet adjuvant de la flagelline par voie nasale. Par une approche transcriptomique sur le poumon entier, nous avons identifié une signature associée à l'effet adjuvant. Cette signature est retrouvée dans les cellules radorésistantes et plus particulièrement les cellules épithéliales bronchiques et alvéolaires de la souris ou de l'Homme. Cette étude montre que l'activité adjuvante des TLR dans les muqueuses peut être

indépendante du compartiment hématopoïétique et donc des CPA. La signalisation épithéliale des TLR étant à l'origine de l'activité immuno-stimulatrice, nous proposons la notion d'adjuvants épithéliaux de l'immunité.

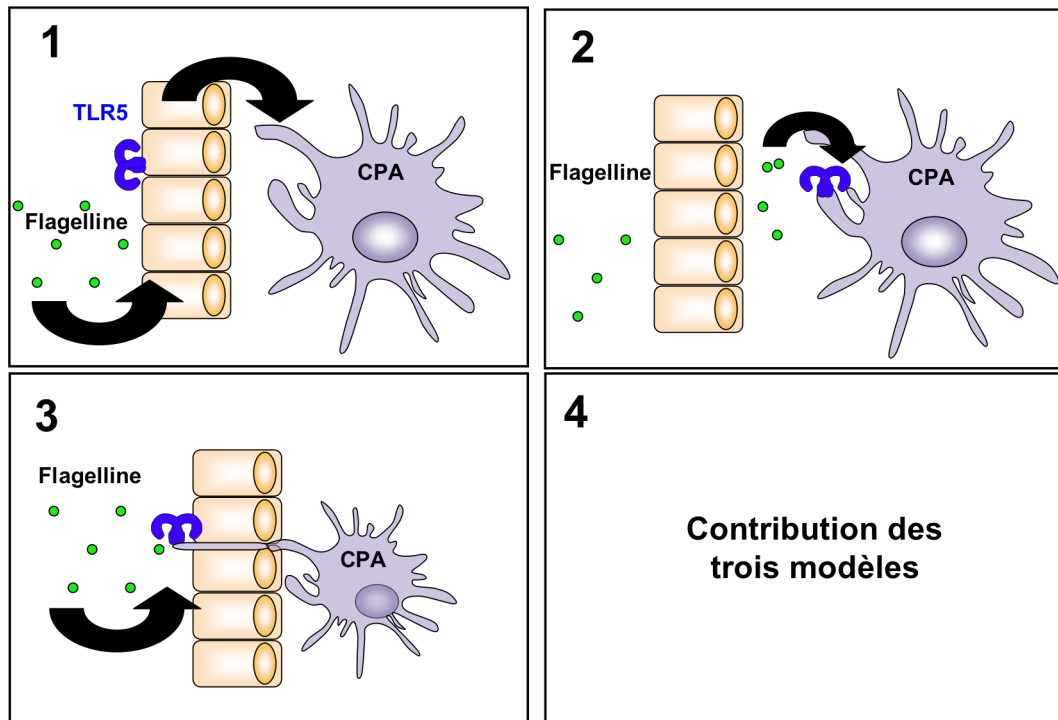


Figure 16 : Modèles d'activation de la cellule présentatrice d'antigène dans les muqueuses.

Quatre modèles d'activation de la cellule présentatrice d'antigène (CPA) sont possibles. (1) L'épithélium détecte la flagelline dans la lumière et transmet le signal de danger dans le compartiment interne. La flagelline active indirectement la CPA. (2) La flagelline traverse la barrière épithéliale et active directement la CPA. (3) La flagelline active directement la CPA intra-épithéliale depuis la lumière. (4) Une contribution des différents modèles permet d'activer les CPA.

Airway epithelial cells regulate TLR5-mediated mucosal adaptive responses

Laurie VAN MAELE^{1,2,3,4}, Laure JANOT^{5,6}, Delphine FOUGERON^{1,2,3,4}, Arnaud DIDIERLAURENT^{7,8}, Bertrand DUBOIS^{9,10}, Martin RUMBO¹¹, Simon JEFFS¹², Delphine CAYET^{1,2,3,4}, Staëlle CHAMAILLARD^{1,2,3,4}, Selma BOULENOUAR^{1,2,3,4}, Tracy HUSSELL⁷, François ERARD^{5,6}, David HOT^{1,2,3,4}, Bernhard RYFFEL^{5,6}, Arndt BENECKE¹³, Jean-Claude SIRARD^{1,2,3,4*}

¹Institut Pasteur de Lille, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille; ²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1019; ³CNRS, UMR 8204; ⁴Univ Lille Nord de France, Lille, France; ⁵University of Orléans; ⁶CNRS Molecular Immunology and Embryology UMR 6218, Institut de Transgenose, Orléans, France; ⁷Imperial College of London, National Heart and Lung Institute, United Kingdom; ⁸Glaxosmithkline Biologicals, Rixensart, Belgium; ⁹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U851; ¹⁰Université Lyon1, IFR128, Lyon, France; ¹¹Universidad Nacional de La Plata, Laboratorio de Investigaciones en el Sistema Inmune, Facultad de Ciencias Exactas, La Plata, Argentina; ¹²Imperial College of London, St Mary Campus, United Kingdom; ¹³Institut des Hautes Études Scientifiques, Bures-sur-Yvette, France;

*Correspondence: Jean-Claude SIRARD, email: jean-claude.sirard@inserm.fr

Abstract

Adaptive immunity depends on activation of antigen-presenting cells (APC) like dendritic cells. In lymphoid tissues, Toll-like receptors (TLR) that detect microbial signals are instrumental in the direct APC stimulation. Most pathogenic microorganisms target the mucosal barriers and their dissemination is circumvented by innate responses regulated by epithelial cells, the main sentinels within mucosa. Here we addressed whether TLR stimulation of non-hematopoietic cells is required to initiate mucosal adaptive immunity. Upon nasal administration of flagellin, lung radioresistant cells were sufficient for promoting the TLR5-mediated T cell- and antibody-mediated immunity. The lung signature in response to flagellin was limited to the broncho-alveolar epithelial compartment and was associated to the production of a restricted set of mediators including the chemokine CCL20, known to promote APC recruitment in mucosal tissues. Our results suggest that TLR-mediated signaling in epithelium is sufficient to transmit activating signals to APC and initiate adaptive immunity. In conclusion, the adaptive immune-enhancing effect of microbial signals on epithelial cells can be harnessed for improving vaccines.

Introduction

The detection of pathogens by pattern recognition receptors including Toll-like receptors (TLRs) is required for the ignition of immune responses (1, 2). TLR detect molecular motifs associated with the microorganisms and eventually their pathogenicity called, microbe-associated molecular pattern (MAMP). Immune or non-immune cells like dendritic cells or epithelial cells express TLRs, respectively (3). In systemic compartment, antigen-presenting cells (APC) like dendritic cells (DC) are the main sentinels (4) (5). DCs are able to trigger innate and adaptive immunity by producing cytokines and chemokines and presenting antigens to lymphocytes. Systemic activation of adaptive immune response by LPS-TLR4 or CpG-TLR9 does not require any contribution of TLR-competent radioresistant cells but only DC activation (6, 7). The actual dogma specifies that direct detection of MAMPs by APCs is absolutely necessary to functionally activate the cells and enhance antigen-specific adaptive immunity (6).

Most life-threatening pathogens target the mucosal barriers and hosts need to rapidly respond to circumvent their dissemination by mucosal innate and adaptive immunity (8). In this context, the epithelial cells covering mucosa are the main sentinels involved in the triggering of innate immunity by sensing microbes through TLRs (9) (3). TLR5 detects flagellins - the main protein of bacterial flagella {Ramos, 2004 #1981}. Flagella are key factor for the colonization of mucosa and flagellins are expressed by bacteria, particularly pathogenic bacteria, in the gut, the lung and the uro-genital tract. TLR5 stimulates MyD88-dependent signaling cascade characterized by the activation of the MAPK and NF- κ B

pathway (1, 10). Flagellin activates TLR5 signaling in various epithelial cell lines from intestine or respiratory tract, resulting in the expression of pro-inflammatory genes encoding cytokines or chemokines (11-16). Upon translocation, flagellated bacteria or flagellin trigger DC activation (17-23). DC-mediated responses are characterized on the one hand by the swift production of IL-17 and IL-22 by CD3^{neg}CD127⁺ innate lymphoid cells T cells (24) and on the other hand by the activation of T cell- and antibody-mediated immunity (22, 25) (18, 26). Thus, flagellin triggers a mixed Th1-Th2 response in spleen and Th17 response in the gut, which are associated to IL-12 p40 and IL-6 cytokine secretion by DCs (22, 26-28).

We and other recently observed that TLR5 signaling in radioresistant lung cells is sufficient to trigger compartmentalized mucosal innate immunity, i.e. synthesis of CXCL cytokines and recruitment of neutrophils (29). Thus, nasal administration of flagellin triggers TLR5-mediated protection against *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus pneumoniae* respiratory infection (30, 31). In addition, *Tlr5*^{-/-} mice are more susceptible to infections by mucosal pathogens such as *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* or uropathogenic *Escherichia coli* (21, 32-34). Besides, flagellin triggers the transient epithelial expression of the DC-specific chemokine CCL20 (also known as MIP-3-alpha or LARC) that in turn attracts immature DC precursors or monocytes (35, 36) (14) (11). Interestingly, *Ccl20* expression in Peyer's patch epithelium is associated to sub-epithelial positioning of DCs producing CCR6, the CCL20-specific receptor and to induction of mucosal adaptive immune responses (37, 38). Using *Ccr6*^{-/-} animals, Le Borgne *et al.* showed that CCR6-dependent APC recruitment is

required to trigger adaptive immunity using microbial compounds as adjuvant for subcutaneous route (39). Recruitment of APCs by epithelial TLR5 signaling may therefore represent the mechanism coupling innate to adaptive immunity in mucosa. Flagellin is an effective TLR5-dependent adjuvant for T cell-mediated and antibody responses by various routes of immunization (22, 25, 27, 40). Mucosal administration of flagellin triggers strong adaptive immune responses, especially secretory IgG and IgA and serum antibodies (27, 28, 41-43). Depending the studies, the mucosal adjuvant properties correlated with the capacity of flagellin to activate TLR5-expressing DCs and/or epithelial cells (22, 28, 43).

However, it remains to be addressed whether epithelial cells are sufficient to initiate an adaptive response by transmitting inducible danger signals to APCs or, whether they regulate the response that has been initiated by direct APC activation via TLRs. The ability of local stromal cells, especially epithelial cells to condition the development of adaptive immunity in response to TLR signaling has been reported. For instance, TLR-stimulated epithelium provides signals to regulate DC activation cells like TSLP (44). Similarly, epithelial production of the B cell-specific cytokines BAFF and APRIL is able to condition antibody response to microorganisms (45, 46). *In vivo*, several studies illustrated that stromal cells and APC crosstalk to provide effective adaptive responses upon TLR stimulation (19, 20, 47). Recently, Hammad *et al.* proposed that epithelial cells are sufficient to drive T cell responses in a TLR4-dependent stimulation of the respiratory tract (48).

Here we addressed whether mucosal adaptive immunity depends on TLR5-dependent epithelial signaling. Using *Tlr5*^{-/-} chimera, we

showed that adaptive immunity to nasal administration of flagellin requires TLR5-expressing structural cells. Indeed, TLR5 expression in the hematopoietic compartment was not associated to any mucosal response. The transcriptional signature of lung response to flagellin was recapitulated by bronchial and alveolar epithelial cells. We therefore found that airway epithelial cells are sufficient to exclusively promote the TLR5-mediated mucosal adjuvant effect. Our results suggest that APC functional activation can be triggered by TLR-independent mechanisms in a TLR-dependent epithelial stimulation. These findings provide further perspectives in the development of new vaccine adjuvants.

Materials and Methods

Mice. Female C57BL/6J, C3H/HeJ, BALB/c or NMRI mice (6-8 weeks old) were purchased from Charles River Laboratories or Janvier (France) and maintained in a specific pathogen-free facility in an accredited establishment (#A59107, Institut Pasteur de Lille ; Transgenose Institute CNRS, Orleans). *Tlr5*^{-/-} (49), *Myd88*^{-/-} (50), backcrossed on C57BL/6J genetic background as well as congenic CD45.1 counterpart C57BL/6J-Ly5.1 were bred in our animal facility. For most experiments, adult (6-10 weeks old) animals were kept in ventilated cages. All experiments complied with current national and institutional regulations and ethical guidelines.

Immunization and sampling. LPS-depleted flagellin FliC from *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium (1µg) produced as described previously (11, 42) or cholera toxin (CT) (1µg, Sigma, USA), diluted in PBS were given by nasal instillation in a volume of 20 µL under light i.p. ketamine-xylazine (1.5 mg and 0.3 mg per 25g animal body weight) or gaseous isoflurane anaesthesia (Belamont, France). We note that the transcriptional activation is higher when isoflurane anesthesia was used. The LPS concentration in flagellin preparations was determined using the Limulus assay (Associates of Cape Cod Inc., USA) was less than 30 pg LPS per µg of FliC. When specified, flagellin was treated for 1h at 37°C with trypsin-EDTA 0.017% (Invitrogen, USA) to hydrolyze the protein, followed by heating at 70°C

for 1h to inactivate trypsin. As mock control, wild type mice were administered with PBS. For most immunization assays, mice were administered i.n. with PBS $\pm$ LPS-depleted ovalbumin (OVA) (20 μ g, Sigma, grade VII, USA or endograde-OVA, Hyglos, Germany) $\pm$ flagellin FliC (1 μ g) on days 1 and 21. Broncho-alveolar lavages (BALs), MdLN, spleen and serum were sampled on day 35 after euthanasia using i.p. injection of 5mg Sodium Pentobarbital (CEVA Santé Animale, France).

BALs were collected after the intra-tracheal injection of 1ml PBS with Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Switzerland) and clarified by centrifugation. Blood samples were collected and clotted at room temperature, with the serum then being separated by centrifugation. Lung protein extracts were prepared by homogenizing tissue in T-PER Tissue Protein Extraction Reagent (Pierce, USA) supplemented with protease inhibitors. All samples were stored at -80°C prior to analysis.

Microarrays

A total of 6 microarrays by condition were realized (6 PBS and 6 flagellin treated). Total RNA was extracted and prepared for hybridization using recommended protocols supplied by the manufacturer (Applied biosystems, USA and Affymetrix, X). Briefly for the 4 Applied Biosystems microarrays, lung mRNA (2 μ g of total RNA) was reverse transcript using a T7-oligo(dT) primer. The double-stranded cDNA obtained, was purified and converted to DIG labeled-cRNA by in vitro transcription with incorporation of DIG-UTP. The cRNA was purified, fragmented and hybridized to Applied Biosystems mouse genome survey V2.0 for 16h. The microarray was washed and revealed by conjugate-alkaline phosphatase-DIG-antibodies and chemiluminescent substrat. The microarrays were scanned with the Applied Biosystems 1700 chemiluminescent microarray analyzer. The data were analyzed by Dr Arndt Benecke (IHES, France) using the NeoNORM method. For the 8 Affymetrix microarrays, the double-stranded cDNA was purified and converted to cRNA by in-vitro transcription with incorporation of biotinylated nucleotides. The cRNA was purified, fragmented and hybridized to Affymetrix GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array. After, microarray were washed and stained for scanning. Datas were analyzed by Dr David Hot (Institut Pasteur de Lille, France) using the RMA (Robust Multichip Average) method.

Bone marrow chimera. Recipient mice were irradiated (1000-1500 rads) and reconstituted 2-to-

24h later with BM cells (4-20 $\times$ 10⁶ cells i.v.). The reconstituted mice were used at 3 months after bone marrow transplantation. The degree of chimerism for different hematopoietic-derived cells type was assessed by measuring CD45.1 and CD45.2 surface expression by leukocytes. The protocol yielded more than 96% of reconstitution in the blood; 90% for *Tlr5*^{-/-} $\rightarrow$ WT and 95% for WT $\rightarrow$ *Tlr5*^{-/-} in lung

Flow cytometry analysis. Spleen and lung were digested with collagenase IA (Sigma, 1 mg/ml) and DNase I (Sigma 40 μ g/ml) during 10 and 20 min at 37°C respectively. Red cells from blood and spleen samples were lyzed and isolated cells were filtered (100 μ m), washed three times and counted. 10⁶ cells were stained for MHCII-FITC, CD11c-APC, CD86-PE, CD45.1-FITC or CD45.2-PE (Becton Dickinson and eBioscience). After extensive washes, cells were analyzed on a Becton Dickinson LSR analyzer or on a BD FACSCalibur.

Analysis of antigen-specific antibody responses

Levels of OVA-specific or GP140-specific antibodies in serum and BAL samples were assessed by ELISA. Briefly, OVA (100 μ g per well in phosphate buffer 0.2M pH 6.5) or GP140 was coated on MaxiSorp microplates (Nalgen Nunc Int., USA) overnight at 4°C. All microplates were washed with PBS/Tween20 0.05% and then blocked with PBS/Dry Milk 1% for 1h at room temperature. Serial dilutions of samples were incubated for 1h at room temperature before development. Biotinylated anti-mouse IgG or IgA antibodies (Southern Biotechnology Associates, USA), HRP-conjugated streptavidin (GE Healthcare, USA) and 3,3',5,5' tetramethylbenzidine (Becton Dickinson Bioscience, USA) were used as development reagents. The reaction was stopped by addition of H₂SO₄ and the OD at 450nm was determined. The IgG titer was defined as the reciprocal of the highest sample dilution yielding an absorbance value of 0.1 OD and was systematically compared with a reference serum. Titers are given as geometrical means of titers from individual mice.

Cytokine-specific ELISA

Cytokine and chemokines levels were measured in serum, BALs, total lung or cell culture supernatant using commercial ELISA kits : R&D Systems (IL-8, CCL20, CXCL2), eBiosciences (IL-13, IFN- γ , IL-4), BD Biosciences (IL-12p40, IL-5, USA).

Gene expression

Total RNA from mouse microdissected or whole lung, BAL or cultured cells was extracted with the Nucleospin RNA II kit or Nucleospin RNA XS kit (Macherey Nagel, Germany). RNA was reverse-transcribed with the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, USA). The resulting cDNA was amplified using SYBR Green- based real time PCR or commercial TaqMan assays (Applied Biosystems). For high throughput analysis, Taqman Low Density Arrays (Applied Biosystems) were used. Analysis was carried out using Real Time StatMiner software (Integromics). Relative mRNA levels ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) were determined by comparing (i) the cycle thresholds (Ct) for the gene of interest and *Actb* (ΔCt) and (ii) ΔCt values for treated and control groups ($\Delta\Delta Ct$). Ct upper limit was fixed to 33 cycles.

Mouse primers		
Target	Forward Sequence	Reverse Sequence
<i>Actb</i>	CGTCATCCATGGCGAACTG	GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT
<i>Ccl20</i>	TTTTGGGATGGAATTGGACAC	TGCAGGTGAAGCCTTCAACC
<i>Cxcl1</i>	CTTGGTTCAGAAAATTGTCCAAA	CAGGTGCCATCAGAGCAGTCT
<i>Cxcl2</i>	CCCTCAACGGAAGAACCAAA	CACATCAGGTACGATCCAGGC
<i>Il12b</i>	GCAAAGAAACATGGACTTGAAGTT	CACATGTCAGTCCCCGAGAGT
<i>Tnf</i>	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACA	CCTCCACTTGGTGGTTTGCT

Human primers		
Target	Forward Sequence	Reverse Sequence
<i>CCL20</i>	CCAAGAGTTTGCTCCTGGCT	TGCTTGCTGCTTCTGATTCTG
<i>H3.3</i>	AGACTGCCCGCAAATCGAC	CTTGCGAGCGGCTTTTGTA
<i>IL8</i>	CACCGGAAGGAACCATCTCA	GGAAGGCTGCCAAGAGAGC
<i>TNF</i>	CCCAGGCAGTCAGATCATCTTC	GGTTTGCTACAACATGGGGCTAC
<i>TNF-α</i>	TGCTTCTGGCTGAGAAAGGG	GAGGTGGAATGGCTCTGGC
<i>ZFP36</i>	GGCGACACCCCTCATG	AGGCTCTCGTAGATGGCAGTCA

Laser microdissection. Whole lung were rinsed with ice chilled PBS and fixed overnight at 4°C in a solution containing 300g sucrose, 5g ZnCl₂, 6g Zn(O₂CCH₃)₂(H₂O)₂, 0.1g Ca(O₂CCH₃)₂ in 1L of 0.1M Tris-HCl pH7.4. Tissues were subsequently embedded in freezing medium OCT compound (Sakura) and frozen. 20µm sections were mounted on Leica slides for microdissection (Leica Microsystems, Wezlar, Germany), stained with cresyl violet as manufacturer procedure (Ambion). Using a LMD microscope AS LMD (Leica Microsystems), epithelial layer of bronchi or alveolar regions were cut out from slides and samples were collected into RNA lysis buffer.

Cell Culture. The normal human bronchial epithelial cell line BEAS-2B and the human bronchial epithelial cell line 16HBE were provided by Dr P. Gosset (Institut Pasteur de Lille, France). BEAS-2B cells were grown in complete human normal epithelial cell culture medium (C-21160, Promocell GmbH, Germany). 16HBE was grown in DMEM medium with 5% FCS. The human carcinoma alveolar epithelial cell line A549 (pneumocyte II) was grown in DMEM/F12 medium with 10% FCS, HEPES 10mM, Sodium Pyruvate 1mM, non-essential amino-acid 1X (Invitrogen, XX). The cell was maintained with penicillin (100U/ml) and

streptomycin (100U/ml) (Invitrogen, XXX) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. At confluency, in a 24-well plate, cells were stimulated with 1-10µg/ml flagellin, ultrapure LPS (10µg/ml) from *Escherichia coli* (serotype O111: B4, Invivogen, Toulouse, France), phosphorothioate CpG oligonucleotide (50µg/ml, 5'-TCCATGACGTTCTGATGCT-3'), poly(I-C) (10µg/ml) or Pam3CSK4 (10µg/ml), and assessed for RNA or protein level.

Statistical analysis

Statistical differences were analyzed using the Mann-Whitney test and were considered to be significant for p values <0.05 . Unless otherwise specified, results are expressed as arithmetic means $\pm$ standard deviation. The Limma test with Benjamini-Hochberg FDR correction for high throughput PCR were used.

In situ hybridization

It was performed as previously described (51). Briefly *CCL20*-specific ³⁵S -labeled riboprobes were synthesized from a plasmid vector pKS containing full coding region. Paraformaldehyde-fixed frozen sections were protease-treated, washed and the slides were hybridized at 45°C overnight with a labeled probe at 2×10^6 cpm/10mL. After RNase treatment and washes, the radioactive probe bound to tissue section mRNA specific for *CCL20* was detected by 2–4 weeks exposure to emulsion autoradiography using NTB-2 emulsion (Eastman Kodak Co.). As negative control, antisense probe was used.

Results

Early mucosal TLR5 signaling stimulates local and systemic adaptive responses

Previous studies show that the TLR5 agonist flagellin carries adjuvant properties to co-administered antigens when delivered by the respiratory route in mice (27, 28, 42, 43, 52). Here we defined the nature and the magnitude of the antibody and T cell response stimulated via intranasal route by the *S. Typhimurium* flagellin FliC using ovalbumin (OVA) as a model antigen (Fig.1 and supplementary Fig1A-C). We found that flagellin like cholera toxin (CT) the gold standard mucosal adjuvant significantly potentiated the systemic and local antibody response in mice. OVA-specific

antibody levels were increased about 100-fold for IgG in broncho-alveolar lavages (Fig.1 and Supplementary Fig.1) and 10-fold for secretory IgA (data not shown). In serum, levels of antigen-specific IgG1 were increased more than 100-fold (Fig.1B and Supplementary Fig.1B) whereas IgG2a or IgG2c production was not notably affected (data not shown). Such isotype pattern is characteristic of Th2-biased responses. To further examine the Th response, cells from mediastinal lymph nodes (MdLN) of immunized animals were activated in vitro with OVA (Fig.1 and Supplementary Fig.1). In agreement with antibody pattern, the OVA-specific response potentiated by flagellin was characterized by the production of Th2-specific interleukines IL13 and IL-5 but also the Th1-specific cytokine IFN- γ . These findings support the idea that flagellin activity on mucosa enhances a mixed Th1-Th2 lymphocyte differentiation as well as IgA and IgG release in secretions, a feature of mucosal adjuvant.

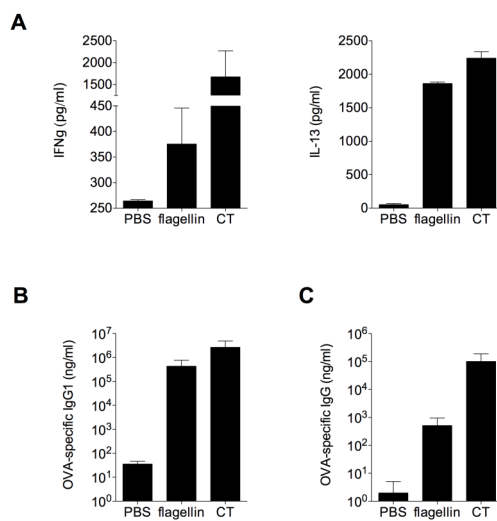
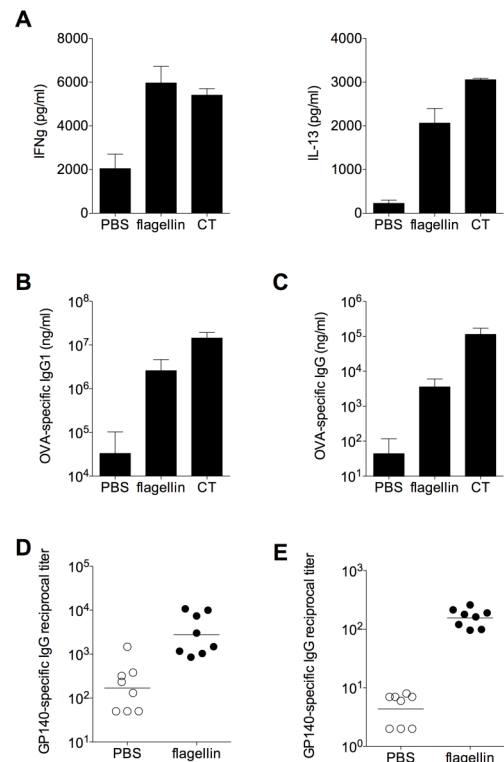


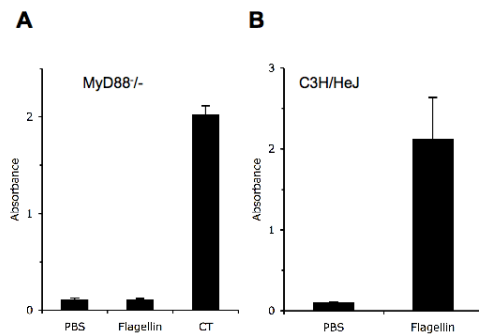
Figure 1: Mucosal administration of TLR5 agonist stimulates mucosal and systemic adaptive immunity. C57BL/6 mice (n=6) were immunized i.n. at days 1 and 21 with ovabumin (OVA) supplemented with phosphate buffer saline (PBS), flagellin or cholera toxin (CT). (A,) OVA-specific T cells response. Mediastinal lymph node cells were collected at day 10 and stimulated 72h with OVA and OVA-specific cytokines levels in supernatant were determined by ELISA. (B, C) OVA-specific antibody response. Serum (B) and broncho-alveolar lavages (C) were collected at day 35 and levels of OVA-specific IgG1 and IgG were determined by ELISA. Results are expressed as mean $\pm$ SD. Statistical significance ($P < 0.05$) was assessed by Mann and Whitney test compared to the PBS group.



Supplementary Figure 1: Adjuvant effect of flagellin is independent of mice strain or antigen.

BALB/c mice (n=6) were immunized i.n. at days 1 and 21 with ovabumin (OVA) supplemented with phosphate buffer saline (PBS), flagellin or cholera toxin (CT). (A) OVA-specific T cells response. Mediastinal lymph node cells were collected at day 10 and stimulated 72h with OVA and OVA-specific cytokines levels in supernatant were determined by ELISA. (B, C) OVA-specific antibody response. Serum (B) and broncho-alveolar lavages (C) were collected at day 35 and levels of OVA-specific IgG1 and IgG were determined by ELISA. (D, E) GP140-specific antibody response. NMRI mice (n=6) were immunized i.n. at days 1 and 21 with GP140 supplemented with PBS or flagellin (1 μ g). Serum (D) and broncho-alveolar lavages (E) were collected at day 35 and levels of GP140-specific IgG were determined by ELISA. (A-C) Results are expressed as mean $\pm$ SD, (D, E) antibody titer of each animal is represented individually and geometric mean are note with a line. Statistical significance ($P < 0.05$) was assessed by Mann and Whitney test compared to the PBS group.

The flagellin mucosal activity on adaptive immunity was independent of genetic backgrounds and antigen since BALB/c, C3H/HeJ or outbred animals (NMRI) were able to mount such response against OVA or the HIV-derived recombinant GP140 protein (Supplementary Fig.1-2). As expected, the adjuvant effect of flagellin was found depend on MyD88 but not TLR4 (Supplementary Fig.2). In contrast, cholera toxin enhanced adaptive immune responses independently of these factors.



Supplementary Figure 2: Flagellin-specific mucosal responses are MyD88-dependent but TLR4-independent.

MyD88-deficient mice (n=3-5) (A) and C3H/HeJ mice (LPS-hyporesponsive) (n=4) (B) were immunized i.n. at days 1 and 21 with Ovabumin (OVA) supplemented with phosphate buffer saline (PBS), flagellin or cholera toxin (CT). Sera were collected at day 35 and levels of OVA-specific IgG were determined by ELISA. Results represent the mean absorbance $\pm$ SD of 180-fold dilution of serum.

Flagellin activates a gene expression program specific for regulated mucosal immune responses

TLR signaling is characterized by a swift and strong transcriptional activation. Variations in particular transcripts might reflect changes in the immune activity of the respiratory tract. To get further insights in the mechanisms of mucosal adjuvant effect, we perform microarrays analysis on lungs from C3H/HeJ animals that were stimulated with flagellin for 1h, a short period that minimize any effect of tissue remodeling by immune cell infiltrates (Fig.2). Analysis revealed 34 genes for which expression is upregulated by flagellin treatment (Supplementary table 1), no gene was down-regulated 1h post-instillation. The flagellin-mediated lung response is enriched for genes that are associated with immunity, particularly those that encode chemokines, cytokines, and innate immunity receptors. The second group of genes consists almost entirely of those encoding transcriptional activators and negative regulators of innate signaling. NF-kappaB is an important regulator of TLR-mediated responses that has to be controlled in a timely manner since excessive or sustained signaling can cause tissue damage. The third group of genes induced by flagellin treatment encodes factors involved in cell differentiation or repair. This set of genes may limit lung damages caused by cellular

infiltration or inflammation. A few genes with uncharacterized function or sequence coding for putative genes were also upregulated in our model. These sequences need further investigations to define their contribution in the flagellin-mediated lung responses. The microarray results were validated by qPCR genes expression analysis and the correlation ($R^2=0.8892$) was highly significant (Fig.2).

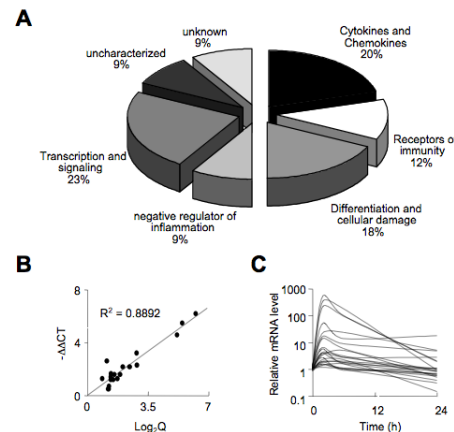
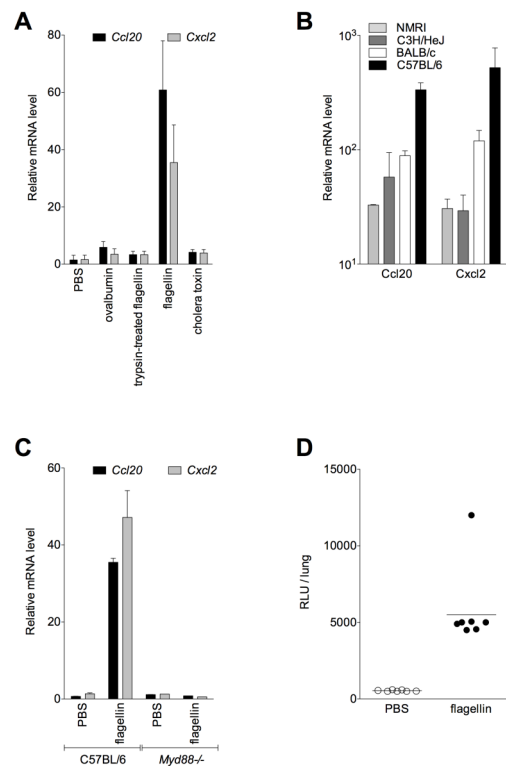


Figure 2: TLR5 activation promotes an early and transient lung pro-inflammatory signature.

C3H/HeJ mice (A, B) or C57BL/6 mice (C) (n=4-8) were treated i.n. with PBS or flagellin (1μg). (A, B) Total lung RNA were extracted 1h later and processed for hybridization on microarrays or qPCR analysis. (A) Classification by biological function of genes differentially expressed after flagellin treatment. (B) Correlation between microarrays signal intensity (logQ) and qPCR results (-ΔΔCT). (C) Kinetic analysis of transcription. Genes identified with the microarrays analysis are analyzed in a time-dependent manner. For qPCR normalization, the gene *Actb* was used and results are expressed as mean.

As expected, the pulmonary transcriptional response to flagellin was independent of genetic background (Supplementary Fig.3). Indeed, the same gene expression pattern was found in C3H/HeJ, BALB/C, C57BL/6 or NMRI mice. Furthermore this response is dependent on MyD88 signal and NF-κB activation (Supplementary Fig.3).



Supplementary Figure 3 : Features of transcriptional response to flagellin.

Mice (n=3-4) were treated i.n. with PBS or flagellin (1µg). *Ccl20* (black bar) and *Cxcl2* (grey bar) -specific mRNA levels in lung were defined 2h later by qPCR. (A) C57BL/6 mice were treated with PBS, ovalbumin, trypsin-treated flagellin, flagellin or cholera toxin. (B) Response from C57BL/6, BALB/C, C3H/HeJ or NMRI mice. (C) Response from C57BL/6 and *Myd88*^{-/-} mice. Results are expressed as mean ± SD relative to PBS group. (D) Flagellin-mediated NF-κB activation in mucosa. NF-κB-luciferase mice (n=7) were treated with PBS (open circle) or flagellin (1µg) (black circle). The luciferase activity was assessed in lung 3h later. Results represents the relative luminescence unit by lung in each mouse.

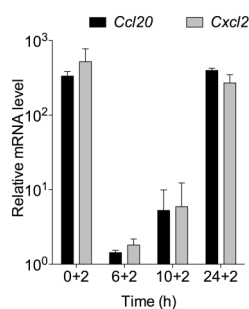
Gene symbol	Gene Name	Applied Biosystems		Affymetrix		Real Time PCR
		Probe ID	logQ	ID	M	-ΔΔCT
<i>3300001A09Rik</i>	RIKEN cDNA 3300001A09 gene	446574	1,46	1453326_at	0,87	1,6
<i>4833414E09Rik</i>	RIKEN cDNA 4833414E09 gene	577596	-0,02	1430183_at	0,52	1,2
<i>8430408G22Rik (Fseq)</i>	RIKEN cDNA 8430408G22 gene (fat specific)	632184	1,24	1433836_a_at	0,65	1,2
<i>Areg</i>	amphiregulin	915752	1,30	1421134_at	1,35	1,6
<i>Atf3</i>	activating transcription factor 3	576652	2,33	1449363_at	2,84	2,2
<i>Btg2</i>	B-cell translocation gene 2, anti-proliferative	732315	0,76	1416250_at	1,02	ND
				1448272_at	1,12	
<i>Ccl20</i>	chemokine (C-C motif) ligand 20	354686	2,29	1422029_at	3,90	6,2
<i>Ccl3</i>	chemokine (C-C motif) ligand 3	852613	1,27	1419561_at	1,50	1,7
<i>Ccr12</i>	chemokine (C-C motif) receptor-like 2	454482	1,10	1427736_a_at	0,92	ND
<i>Csf2</i>	colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	596035	1,15	1427429_at	1,77	0,7
<i>Cxcl1</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	759375	6,15	1457644_s_at	4,67	6,2
				1419209_at	5,29	
<i>Cxcl10</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	930152	0,76	1441855_x_at	2,14	1,3
<i>Cxcl2</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	314329	5,37	1418930_at	1,38	5,5
<i>Egr1</i>	early growth response 1	524988	1,74	1449984_at	4,62	ND
<i>Egr2</i>	early growth response 2	932668	0,62	1417065_at	1,80	ND
<i>Fos</i>	FBJ osteosarcoma oncogene	463565	1,54	1427683_at	1,02	ND
<i>Gadd45b</i>	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta	612691	1,38	1423100_at	1,36	ND
				1450971_at	0,97	1,2
<i>Gdf15</i>	growth differentiation factor 15	786761	2,75	1449773_s_at	1,08	3,2
<i>Ier2</i>	immediate early response 2	332032	1,56	1418949_at	2,25	ND
<i>Ier3</i>	immediate early response 3	905471	1,16	1416442_at	1,46	ND
<i>Il1a</i>	interleukin 1 alpha	595893	0,97	1419647_a_at	1,00	ND
<i>Jun</i>	Jun oncogene	534427	1,09	1421473_at	1,73	2,5
				1417409_at	0,89	0,5
<i>Junb</i>	Jun-B oncogene	631627	1,62	1448694_at	0,66	1,3
<i>Maff</i>	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein F (avian)	380532	0,99	1415899_at	1,96	ND
<i>Nfkb1a</i>	nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	635842	1,25	1418936_at	1,14	ND
				1448306_at	1,29	1,4
				1449731_s_at	1,13	
<i>nfkbiz</i>	nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta	482937	2,75	1420088_at	0,51	2,3
				1438157_s_at	0,91	
<i>Osgin1</i>	oxidative stress induced growth inhibitor 1	516182	1,44	1420089_at	0,77	ND
<i>Phlda1</i>	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	674723	1,38	1417483_at	3,24	ND
<i>Tlr2</i>	toll-like receptor 2	824050	0,44	1448728_a_at	3,42	ND
<i>Tnf</i>	tumor necrosis factor	381078	5,07	1457404_at	1,29	ND
<i>Tnfaip3</i>	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	303607	1,95	1424022_at	0,85	ND
				1418835_at	1,48	ND
<i>Zfp36</i>	zinc finger protein 36	641341	1,78	1419132_at	0,59	ND
				1419607_at	2,74	4,6
				1433699_at	2,35	2,2
				1450829_at	2,29	
				1452519_a_at	1,73	1,6

Pathway	Referenced	Observed	Expected	+/-	P value
Inflammation mediated by cytokine and chemokine signaling pathway	300	16	4.12	+	5.78E-06
T cell activation	131	9	1.8	+	1.03E-04
Apoptosis signaling pathway	134	8	1.84	+	6.19E-05
Toll receptor signaling pathway	60	5	0.82	+	1.58E-03
TGF-beta signaling pathway	153	6	2.1	+	2.02E-02
B cell activation	91	4	1.25	+	3.81E-02
Unclassified	21177	273	291.14	-	1.55E-03

Supplementary Table 1: Flagellin-dependent gene expression in lung.

Microarray signals (Log₂Q or M) and qPCR (-ΔΔCT) gene expression data from lung of C3H/HeJ mice (n=6) treated i.n. with flagellin (1μg) for 1h and normalized to PBS-treated animals. Molecular pathways activated by a flagellin treatment. ND= not determined.

According to the microarrays results, we investigated the lung response to flagellin in a time-dependent manner. We treated C57BL/6 mice with 1 μ g of flagellin. At different time point, we determined the relative gene expression level in lung (Fig.3A) and the protein level in lung (Fig.3B) and BAL (Fig.3C) of two representative chemokines CXCL2 and CCL20. We observe a rapid expression of mRNA with a global maximum at 2h and a rapid production of the chemokines with a global maximum at 6h. This expression is intense (350 and 30ng/ml for CCL20, 550 and 8ng/ml for CXCL2, relative RNA level and protein concentration in lung respectively) but transient to return at steady state at 24h. This result are consistent with the fact that the regulation of the early innate response is primordial for an effective immunity. This typical TLR signature is found for all the genes revealed by the microarrays analysis (Fig.2C). Interestingly, after a flagellin exposition, the lung tissue is tolerant to an another activation of TLR5 in a 24h window (Supplementary Fig.4). This observation correlates with the transcriptional pattern of flagellin response (Fig.2C) and this effect is probably the consequence of the production of regulatory factors of TLR5 signaling cascade like I κ B α or A20.



Supplementary Figure 4 : TLR5-mediated flagellin response induces tolerance to a secondary stimulation.

At t=0, C57BL/6 mice (n=3 per group) were treated with flagellin (1 μ g) or PBS. At indicated time, mice were re-stimulated for 2h with flagellin or PBS and lung were sampled for mRNA analysis. Results were normalized with each +2h PBS group. *Ccl20* (grey bars) and *Cxcl2* (black bars)-specific mRNA level were determined by qPCR with *Actb* normalization. Results are expressed as mean $\pm$ SD.

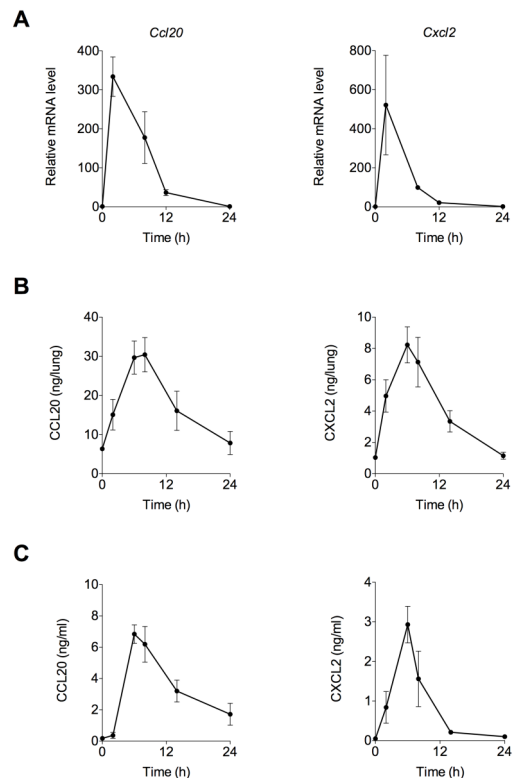


Figure 3: Time course analysis of pulmonary CCL20 and CXCL2 response to flagellin.

C57BL/6 mice (n=4-6) were treated i.n with PBS or flagellin (1 μ g). At indicated times, lung gene expression (A) and chemokine levels in lungs (B) or broncho-alveolar lavages (BAL) (C) were analyzed. Results are expressed as mean $\pm$ SD for mRNA and mean $\pm$ SEM for proteins.

Flagellin-mediated mucosal immunity requires radioresistant cells

We hypothesized that the immune responses to flagellin are mainly mediated by the epithelium. In other word, the epithelium detects the flagellin (danger signal) and promotes the adaptive response to flagellin. In order to improve this model, we generated bone marrow chimera mice for TLR5. Irradiated wild type (WT, C57BL/6J) and TLR5-deficient mice were reconstituted with bone marrow cells from WT or TLR5-deficient mice to obtain *Tlr5*^{-/-}→WT and WT→*Tlr5*^{-/-} chimera. We tested the responsiveness of hematopoietic compartment of *Tlr5*^{-/-}→WT chimera (Supplementary figure 5). Mice were treated i.p. with PBS, flagellin or LPS for 16h and the activation of dendritic cells (increase of CD86 marker) was determined in spleen. Our results show an activation of DC by the LPS treatment but not by flagellin (supplementary Fig.5A). Same results were obtained in

MyD88^{-/-}→WT chimera. Although the hematopoietic cells of *Tlr5*^{-/-}→WT were unable to respond to flagellin, the mucosal adjuvant properties of flagellin were not altered (Fig.4A and Supplementary Fig.5B, C). These data showed that flagellin significantly induces a systemic and local ova-specific IgG1 response in chimera *Tlr5*^{-/-}>WT (mice with a TLR5-expressing radio-resistant compartment). The same result was observed for the transcriptional response to flagellin (Fig. 4B-C). Altogether, our results suggested that radioresistant cells are crucial to establish the innate and adaptive immune response to flagellin in lung mucosa.

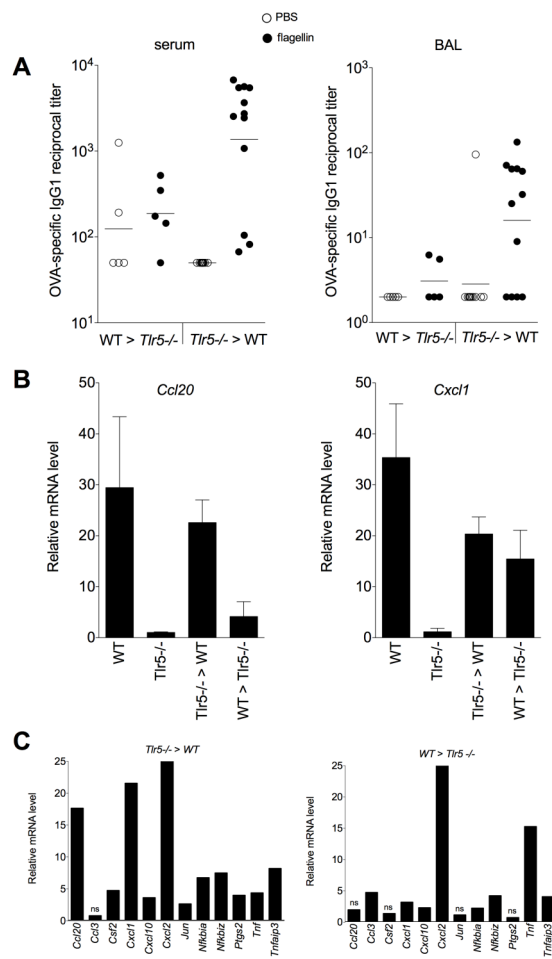
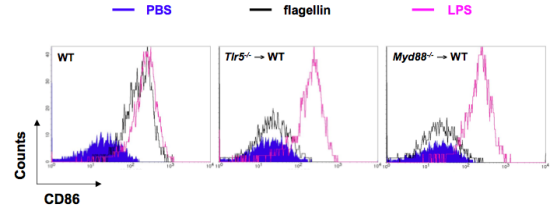


Figure 4: Flagellin-mediated immunity only requires TLR5-responsive radioresistant cells

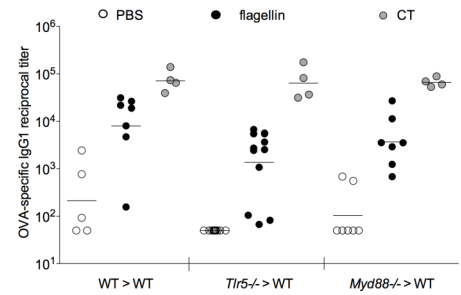
C57BL/6 (WT) → *Tlr5*^{-/-} and *Tlr5*^{-/-} → WT bone marrow chimera mice were immunized i.n. at day 1 and 21 with ovalbumin (OVA) supplemented with PBS or flagellin (1μg). (A) OVA-specific antibody response. Serum and broncho-alveolar lavage (BAL) were collected at day 35 and levels of OVA-specific IgG1 were determined by ELISA. (B) Radioresistant cells-specific expression of *Ccl20* and *Cxcl1*. At day 35 C57BL/6 (WT), *Tlr5*^{-/-} and chimera mice were treated i.n. for 3h30 with PBS or flagellin (1μg). *Ccl20* and *Cxcl1* mRNA levels in lung was determined by qPCR with *Actb* normalization. (C) Lung

transcriptional signature after instillation of flagellin. Chimera mice were treated i.n. for 1h with PBS or flagellin (1μg). mRNA levels are expressed relative to each PBS group. Results are expressed as mean ± SD. In C, all genes display p<0.05 in Limma test (except genes indicated by ns).

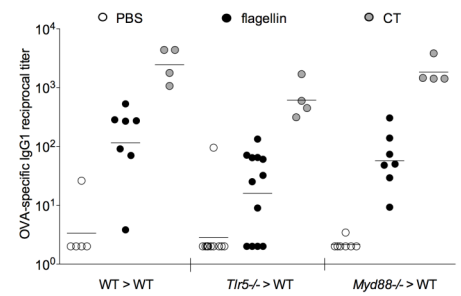
A



B



C



Supplementary Figure 5 : Radioresistant cells are essential for adjuvant effect of flagellin.

(A) Chimera mice do not respond to i.p. flagellin administration. C57BL/6 (WT) → WT, *Myd88*^{-/-} → WT and *Tlr5*^{-/-} → WT bone marrow chimera mice were treated i.p. with PBS, flagellin (1μg) or LPS (1μg). 16h later, spleen dendritic cells (CD11c⁺ MHCII⁺) activation was assessed by flow cytometry. (B, C) OVA-specific antibody response. C57BL/6 (WT) → WT, *Myd88*^{-/-} → WT and *Tlr5*^{-/-} → WT bone marrow chimera mice were immunized i.n. at day 1 and 21 with ovalbumin (OVA) supplemented with PBS, flagellin (1μg) or cholera toxin (CT) (1μg). Serum (B) and broncho-alveolar lavage (C) were collected at day 35 and levels of OVA-specific IgG1 were determined by ELISA. Antibody titer of each animal is represented individually and geometric mean are note with a line.

Bronchial epithelial cells as the major source of *Ccl20*

The lung mucosa is mainly constituted by structural cells (epithelial cell) and resident immune cells like macrophages. To analyze the responsiveness of macrophages to flagellin, we stimulated naïve pulmonary and

alveolar macrophages (expression of F4/80) with various TLR agonists and determined the IL-12 p40 production in supernatant (Fig.5A). Alveolar macrophages responded to TLR9 (CpG), TLR4 (LPS) and TLR3 (poly(I-C)) stimulation. Pulmonary macrophages responded only to LPS. Interestingly, lung macrophages were not activated by *in vitro* flagellin stimulation. To exclude the role of TLR5 signaling in mucosal immune cells, we collected BALs cells from mice stimulated with flagellin or LPS (Fig.5B). BAL cells expressed low levels of *Ccl20*, *Tnf* and *Il12b* mRNA in response to flagellin or LPS i.n. administration. These results suggested that the structural cells, especially epithelial cells, are the main sentinels involved in the establishment of innate and adaptive lung immune responses to flagellin.

Lung epithelium can be divided in two compartments: the bronchial epithelium and the alveolar epithelium. In order to define which epithelium respond to flagellin, we isolated by laser microdissection the bronchial epithelium and the alveolar compartment (including epithelial, endothelial and other structural cells). C57BL/6 mice were instilled with flagellin, and lung and BAL cells were sampled at 2h. In addition, lung was processed for laser microdissection. *Ccl20* mRNA levels of bronchial epithelium and alveolar compartment were determined by qPCR. (Fig.4d). We observed that *Ccl20* is essentially expressed by bronchial epithelium compared to whole lung expression level. Alveolar compartment or BAL cells contributed only at a minor part to the lung immune response. The same observations were done in the intestine (Supplementary Fig. 6). Indeed, the administration of flagellin into ileum lumen, induced *Ccl20* transcription in enterocytes. These results supported the hypothesis in which epithelium plays a unique role in transduction of microbial signals from the lumen to the APC located in the internal compartment, in order to enhance the appropriate adaptive response. Indeed, CCL20

could contribute to the recruitment of immune cells like dendritic cells.

The normal human bronchial epithelial cell line, BEAS-2B was stimulated for 2h with flagellin. Pro-inflammatory gene expression was analyzed by qPCR (Fig.5D). The bronchial cell was highly responsive to flagellin as described with microdissected lung (Fig.5C). Not only *CCL20* but also *IL8* (CXCL8), *TNF*, *A20* and *ZFP36* genes were upregulated in flagellin-treated group. Similar results were obtained with the bronchial epithelial cell line 16HBE whereas the alveolar epithelial cell line A549 showed a lower response to flagellin treatment (supplementary Fig.7). We observed the same kinetic of *CCL20* expression and IL-8 secretion than in the mouse model. These results suggested that bronchial epithelium recapitulates the lung response and that this compartment exclusively drives the adaptive immunity.

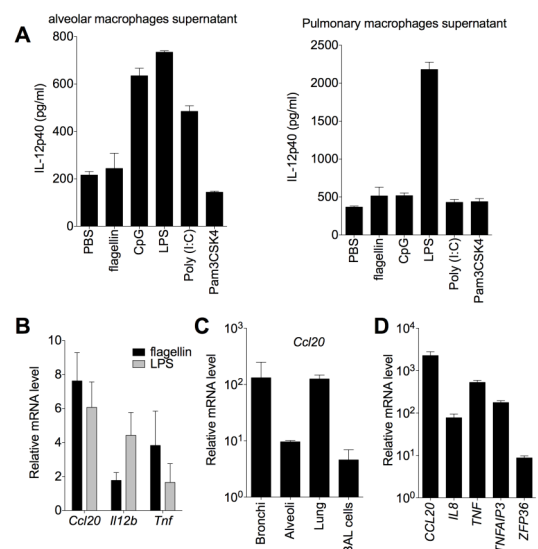
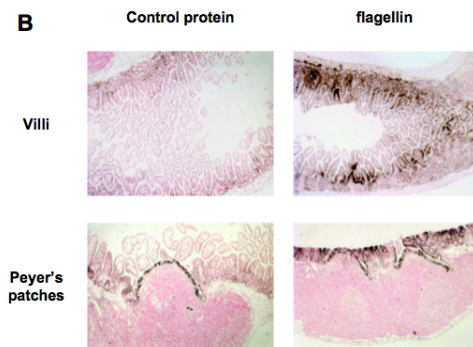
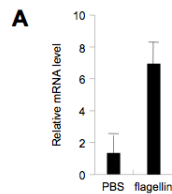
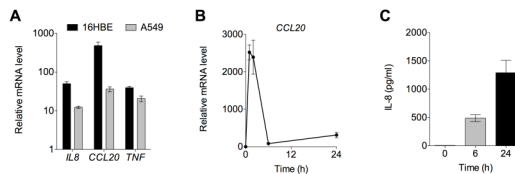


Figure 5 : Lung epithelial cells respond to flagellin

(A) Airways macrophages response to *in vitro* TLR agonist stimulation. Alveolar macrophages from BAL or pulmonary macrophages from lung of naïve C57BL/6 mice (n=6) were stimulated for 72h with PBS, flagellin (10µg/ml), CpG (50µg/ml), LPS (10µg/ml), poly(I-C) (10µg/ml) or Pam3CSK4 (10µg/ml). Concentration of p40IL-12 in supernatant was defined by ELISA. (B, C) C57BL/6 mice were treated i.n. for 2h with flagellin (1µg) or LPS (1µg). (B) Pro-inflammatory gene expression of BAL cells was analyzed by qPCR. (C) whole lung were prepared for laser microdissection. *Ccl20*-specific-mRNA level in each enriched lung compartment (bronchi and alveoli) and BAL cells was determined by qPCR. For the normalization, the *Actb* gene expression was used. (D) Activation of human bronchial epithelial cells after flagellin treatment. Normal bronchial epithelial cell line BEAS-2B was treated for 1h with flagellin (1µg/ml). Total cell RNA was extracted and pro-inflammatory gene expression analyzed by qPCR with a H3.3 normalization. Results are expressed as mean ± SD.



Supplementary Figure 6 : Intestinal epithelium responds to apical exposure of flagellin. Ovalbumin as a control protein or flagellin (100 µg) were injected for 2h in ileal ligated loops of C57BL/6 mice (n=3). (A) mRNA level of *Ccl20* was measured in total ileum by qPCR. (B) *Ccl20*-specific *in situ* hybridization.



Supplementary Figure 7 : Bronchial and alveolar epithelial cells respond transiently to flagellin. Human bronchial epithelial cell line 16HBE or BEAS-2B and human alveolar epithelial cell line A549 were stimulated with 1µg/ml of flagellin. (A) 16HBE and A549 cells were treated for 1h and proinflammatory gene expression was analyzed by qPCR. (B) At indicated time, *CCL20*-specific gene expression of BEAS-2B cells was defined by qPCR. (C) BEAS-2B cells were treated for 24h and IL-8-specific protein level was determined by ELISA. Results are expressed as mean ± SD.

Discussion

See general discussion of the thesis manuscript.

Acknowledgements

We thank Dr. Christophe Carnoy and Christelle Faveeuw for critical reading of the manuscript. LVM, DC, DF, SC, and JCS are funded by INSERM, Institut Pasteur de Lille, Région Nord Pas de Calais (ARCir Europe), Univ Lille Nord

de France, ANRS (2008/058), INSERM-CONICET joint project (n°174) and European Community (STREP grant SavinMucoPath INCO-CT-2006-032296).

References

1. Takeuchi, O., and S. Akira. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140:805-820.
2. Beutler, B., Z. Jiang, P. Georgel, K. Crozat, B. Croker, S. Rutschmann, X. Du, and K. Hoebe. 2006. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu Rev Immunol* 24:353-389.
3. Abreu, M. T. 2010. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat. Rev. Immunol.* 10:131-144.
4. Helft, J., F. Ginhoux, M. Bogunovic, and M. Merad. 2010. Origin and functional heterogeneity of non-lymphoid tissue dendritic cells in mice. *Immunol. Rev.* 234:55-75.
5. Auffray, C., M. H. Sieweke, and F. Geissmann. 2009. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27:669-692.
6. Joffre, O., M. A. Nolte, R. Sporri, and C. Reis e Sousa. 2009. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol. Rev.* 227:234-247.
7. Sporri, R., and C. Reis e Sousa. 2005. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function. *Nat. Immunol.* 6:163-170.
8. Sansonetti, P. J. 2004. War and peace at mucosal surfaces. *Nat. Rev. Immunol.* 4:953-964.
9. Fritz, J. H., L. Le Bourhis, J. G. Magalhaes, and D. J. Philpott. 2008. Innate immune recognition at the epithelial barrier drives adaptive immunity: APCs take the back seat. *Trends Immunol.* 29:41-49.
10. 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.
11. Sierro, F., B. Dubois, A. Coste, D. Kaiserlian, J. P. Kraehenbuhl, and J. C. Sirard. 2001. Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13722-13727.
12. Gewirtz, A. T., P. O. Simon, C. K. Schmitt, L. J. Taylor, C. H. Hagedorn, A. D. O'Brien, A. S. Neish, and J. L. Madara. 2001. *Salmonella typhimurium* translocates flagellin across intestinal epithelia, inducing a proinflammatory response. *Journal of Clinical Investigation* 107:99-109.
13. Eaves-Pyles, T., K. Murthy, L. Liaudet, L. Virag, G. Ross, F. G. Soriano, C. Szabo, and A. L. Salzman. 2001. Flagellin, a novel mediator of *Salmonella*-induced epithelial activation and systemic inflammation: I kappa B alpha degradation, induction of nitric oxide synthase, induction of proinflammatory mediators, and cardiovascular dysfunction. *J. Immunol.* 166:1248-1260.
14. Bambou, J. C., A. Giraud, S. Menard, B. Begue, S. Rakotobe, M. Heyman, F. Taddei, N. Cerf-

- Bensussan, and V. Gaboriau-Routhiau. 2004. In vitro and ex vivo activation of the TLR5 signaling pathway in intestinal epithelial cells by a commensal *Escherichia coli* strain. *J. Biol. Chem.* 279:42984-42992.
15. Didierlaurent, A., J. Goulding, S. Patel, R. Snelgrove, L. Low, M. Bebién, T. Lawrence, L. S. van Rijt, B. N. Lambrecht, J. C. Sirard, and T. Hussell. 2008. Sustained desensitization to bacterial Toll-like receptor ligands after resolution of respiratory influenza infection. *J. Exp. Med.* 205:323-329.
16. Ramos, H. C., M. Rumbo, and J. C. Sirard. 2004. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol.* 12:509-517.
17. Bates, J. T., S. Uematsu, S. Akira, and S. B. Mizel. 2009. Direct stimulation of Tlr5+/- CD11c+ cells is necessary for the adjuvant activity of flagellin. *J. Immunol.* 182:7539-7547.
18. Uematsu, S., K. Fujimoto, M. H. Jang, B. G. Yang, Y. J. Jung, M. Nishiyama, S. Sato, T. Tsujimura, M. Yamamoto, Y. Yokota, H. Kiyono, M. Miyasaka, K. J. Ishii, and S. Akira. 2008. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat. Immunol.* 9:769-776.
19. Sanders, C. J., D. A. Moore, 3rd, I. R. Williams, and A. T. Gewirtz. 2008. Both radioresistant and hemopoietic cells promote innate and adaptive immune responses to flagellin. *J. Immunol.* 180:7184-7192.
20. Salazar-Gonzalez, R. M., A. Srinivasan, A. Griffin, G. Muralimohan, J. M. Ertelt, R. Ravindran, A. T. Vella, and S. J. McSorley. 2007. Salmonella flagellin induces bystander activation of splenic dendritic cells and hinders bacterial replication in vivo. *J. Immunol.* 179:6169-6175.
21. Uematsu, S., M. H. Jang, N. Chevrier, Z. Guo, Y. Kumagai, M. Yamamoto, H. Kato, N. Sougawa, H. Matsui, H. Kuwata, H. Hemmi, C. Coban, T. Kawai, K. J. Ishii, O. Takeuchi, M. Miyasaka, K. Takeda, and S. Akira. 2006. Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells. *Nat. Immunol.* 7:868-874.
22. Didierlaurent, A., I. Ferrero, L. A. Otten, B. Dubois, M. Reinhardt, H. Carlsen, R. Blomhoff, S. Akira, J. P. Kraehenbuhl, and J. C. Sirard. 2004. Flagellin Promotes Myeloid Differentiation Factor 88-Dependent Development of Th2-Type Response. *J. Immunol.* 172:6922-6930.
23. Means, T. K., F. Hayashi, K. D. Smith, A. Aderem, and A. D. Luster. 2003. The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells. *J. Immunol.* 170:5165-5175.
24. Van Maele, L., C. Carnoy, D. Cayet, P. Songhet, L. Dumoutier, I. Ferrero, L. Janot, F. Erard, J. Bertout, H. Leger, F. Sebbane, A. Benecke, J. C. Renauld, W. D. Hardt, B. Ryffel, and J. C. Sirard. 2010. TLR5 signaling stimulates the innate production of IL-17 and IL-22 by CD3(neg)CD127+ immune cells in spleen and mucosa. *J. Immunol.* 185:1177-1185.
25. McSorley, S. J., B. D. Ehst, Y. Yu, and A. T. Gewirtz. 2002. Bacterial flagellin is an effective adjuvant for CD4(+) T cells in vivo. *J. Immunol.* 169:3914-3919.
26. Cunningham, A. F., M. Khan, J. Ball, K. M. Toellner, K. Serre, E. Mohr, and I. C. MacLennan. 2004. Responses to the soluble flagellar protein FliC are Th2, while those to FliC on *Salmonella* are Th1. *Eur J Immunol* 34:2986-2995.
27. Honko, A. N., N. Sriranganathan, C. J. Lees, and S. B. Mizel. 2006. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. *Infect Immun* 74:1113-1120.
28. Lee, S. E., S. Y. Kim, B. C. Jeong, Y. R. Kim, S. J. Bae, O. S. Ahn, J. J. Lee, H. C. Song, J. M. Kim, H. E. Choy, S. S. Chung, M. N. Kweon, and J. H. Rhee. 2006. A Bacterial Flagellin, *Vibrio vulnificus* FlaB, Has a Strong Mucosal Adjuvant Activity To Induce Protective Immunity. *Infect Immun* 74:694-702.
29. Janot, L., J. C. Sirard, T. Secher, N. Noulin, L. Fick, S. Akira, S. Uematsu, A. Didierlaurent, T. Hussell, B. Ryffel, and F. Erard. 2009. Radioresistant cells expressing TLR5 control the respiratory epithelium's innate immune responses to flagellin. *Eur J Immunol* 39:1587-1596.
30. Munoz, N., V. A. N. M. L., J. M. Marques, A. Rial, J. C. Sirard, and J. A. Chabalgoity. 2010. Mucosal administration of flagellin protects mice from *Streptococcus pneumoniae* lung infection. *Infect Immun*.
31. Yu, F. S., M. D. Cornicelli, M. A. Kovach, M. W. Newstead, X. Zeng, A. Kumar, N. Gao, S. G. Yoon, R. L. Gallo, and T. J. Standiford. 2010. Flagellin stimulates protective lung mucosal immunity: role of cathelicidin-related antimicrobial peptide. *J. Immunol.* 185:1142-1149.
32. Morris, A. E., H. D. Liggitt, T. R. Hawn, and S. J. Skerrett. 2009. Role of Toll-like receptor 5 in the innate immune response to acute *P. aeruginosa* pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297:L1112-1119.
33. Andersen-Nissen, E., T. R. Hawn, K. D. Smith, A. Nachman, A. E. Lampano, S. Uematsu, S. Akira, and A. Aderem. 2007. Cutting edge: Tlr5-/- mice are more susceptible to *Escherichia coli* urinary tract infection. *J. Immunol.* 178:4717-4720.
34. Feuillet, V., S. Medjane, I. Mondor, O. Demaria, P. P. Pagni, J. E. Galan, R. A. Flavell, and L. Alexopoulou. 2006. Involvement of Toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12487-12492.
35. Pichavant, M., A. S. Charbonnier, S. Taront, A. Bricet, B. Wallaert, J. Pestel, A. B. Tonnel, and P. Gosset. 2005. Asthmatic bronchial epithelium activated by the proteolytic allergen Der p 1 increases selective dendritic cell recruitment. *J Allergy Clin Immunol* 115:771-778.
36. Vanbervliet, B., B. Homey, I. Durand, C. Massacrier, S. Ait-Yahia, O. de Bouteiller, A. Vicari, and C. Caux. 2002. Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces. *Eur J Immunol* 32:231-242.
37. Iwasaki, A., and B. L. Kelsall. 2000. Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine. *J. Exp. Med.* 191:1381-1394.
38. Cook, D. N., D. M. Prosser, R. Forster, J. Zhang, N. A. Kuklin, S. J. Abbondanzo, X. D. Niu, S. C. Chen, D. J. Manfra, M. T. Wiekowski, L. M. Sullivan, S. R. Smith, H. B. Greenberg, S. K. Narula, M. Lipp, and S. A. Lira. 2000. CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue. *Immunity* 12:495-503.
39. Le Borgne, M., N. Etchart, A. Goubier, S. A. Lira, J. C. Sirard, N. van Rooijen, C. Caux, S. Ait-Yahia, A. Vicari, D. Kaiserlian, and B. Dubois. 2006. Dendritic Cells Rapidly Recruited into Epithelial Tissues via CCR6/CCL20 Are Responsible for CD8(+) T Cell Crosspriming In Vivo. *Immunity* 24:191-201.

40. Sanders, C. J., Y. Yu, D. A. Moore, 3rd, I. R. Williams, and A. T. Gewirtz. 2006. Humoral immune response to flagellin requires T cells and activation of innate immunity. *J. Immunol.* 177:2810-2818.
41. Huleatt, J. W., V. Nakaar, P. Desai, Y. Huang, D. Hewitt, A. Jacobs, J. Tang, W. McDonald, L. Song, R. K. Evans, S. Umlauf, L. Tussey, and T. J. Powell. 2008. Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin. *Vaccine* 26:201-214.
42. Nempont, C., D. Cayet, M. Rumbo, C. Bompard, V. Villeret, and J. C. Sirard. 2008. Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity. *J. Immunol.* 181:2036-2043.
43. Pino, O., M. Martin, and S. M. Michalek. 2005. Cellular mechanisms of the adjuvant activity of the flagellin component FljB of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium to potentiate mucosal and systemic responses. *Infect Immun* 73:6763-6770.
44. Lee, H. C., and S. F. Ziegler. 2007. Inducible expression of the proallergic cytokine thymic stromal lymphopoietin in airway epithelial cells is controlled by NFkappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:914-919.
45. Shang, L., M. Fukata, N. Thirunarayanan, A. P. Martin, P. Arnaboldi, D. Maussang, C. Berin, J. C. Unkeless, L. Mayer, M. T. Abreu, and S. A. Lira. 2008. Toll-like receptor signaling in small intestinal epithelium promotes B-cell recruitment and IgA production in lamina propria. *Gastroenterol.* 135:529-538.
46. He, B., W. Xu, P. A. Santini, A. D. Polydorides, A. Chiu, J. Estrella, M. Shan, A. Chadburn, V. Villanacci, A. Plebani, D. M. Knowles, M. Rescigno, and A. Cerutti. 2007. Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity* 26:812-826.
47. Sato, A., and A. Iwasaki. 2004. Induction of antiviral immunity requires Toll-like receptor signaling in both stromal and dendritic cell compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16274-16279.
48. Hammad, H., M. Chieppa, F. Perros, M. A. Willart, R. N. Germain, and B. N. Lambrecht. 2009. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat. Med.* 15:410-416.
49. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.
50. Kawai, T., O. Adachi, T. Ogawa, K. Takeda, and S. Akira. 1999. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 11:115-122.
51. Rumbo, M., F. Sierro, N. Debard, J. P. Kraehenbuhl, and D. Finke. 2004. Lymphotoxin beta receptor signaling induces the chemokine CCL20 in intestinal epithelium. *Gastroenterol.* 127:213-223.
52. Strindeliuss, L., M. Filler, and I. Sjöholm. 2004. Mucosal immunization with purified flagellin from *Salmonella* induces systemic and mucosal immune responses in C3H/HeJ mice. *Vaccine* 22:3797-3808.

Résultats complémentaires de l'article 2

Nos résultats indiquent que l'effet adjuvant de la flagelline par administration nasale dépend des cellules structurales radiorésistantes, plus particulièrement les cellules épithéliales. L'épithélium joue donc le rôle de relais du danger microbien du compartiment externe vers les acteurs de l'immunité adaptative du compartiment interne.

Des études complémentaires préliminaires ont donc été réalisées afin de poursuivre la caractérisation des mécanismes à l'origine des réponses adaptatives dépendantes de l'administration nasale de flagelline. Ces investigations ont eu pour but (1) l'identification des cellules présentatrices d'antigènes au sein du tissu pulmonaire et des ganglions associés et (2) la recherche des acteurs moléculaires nécessaires au recrutement et/ou à l'activation indirecte de ces cellules présentatrices d'antigènes.

La flagelline induit un recrutement de neutrophiles et de monocytes dans le tractus respiratoire.

Seize heures après une administration intranasale de flagelline, nous avons analysé par cytométrie en flux les cellules recrutées au sein des 2 compartiments du tractus pulmonaire : le lavage broncho-alvéolaire (LBA) et le parenchyme (poumon). Dans un premier temps, nous avons observé que le LBA et le poumon étaient massivement infiltrés par des neutrophiles ($CD11b^+Gr1^+$). Ce résultat confirme les observations faites par plusieurs équipes de recherche (Feuillet *et al.*, 2006; Honko et Mizel, 2004) (Janot *et al.*, 2009) (Didierlaurent *et al.*, 2008). Le marqueur Gr1 représente les molécules de surface Ly6C et Ly6G qui sont retrouvés sur les monocytes et les neutrophiles. Pour discriminer ces 2 populations, la caractérisation des neutrophiles ($CD11b^+Ly6C^+Ly6G^+$) et des monocytes ($CD11b^+Ly6C^+Ly6G^{neg}$) a donc été entreprise (Figure 17A-B). Nous avons observé un recrutement intense de neutrophiles dans le LBA (~100 fois entre les animaux contrôles et traités) et dans le poumon (~8 fois). De façon similaire, le nombre de monocytes dans le LBA et le poumon a été augmenté ~100 et ~2 fois par le traitement à la flagelline. En revanche, aucun recrutement significatif de cellules dendritiques n'a pu être trouvé (Figure 17C). Ces résultats suggèrent que la réponse dépendante de TLR5 mobilise principalement des neutrophiles et des monocytes dans le tissu pulmonaire.

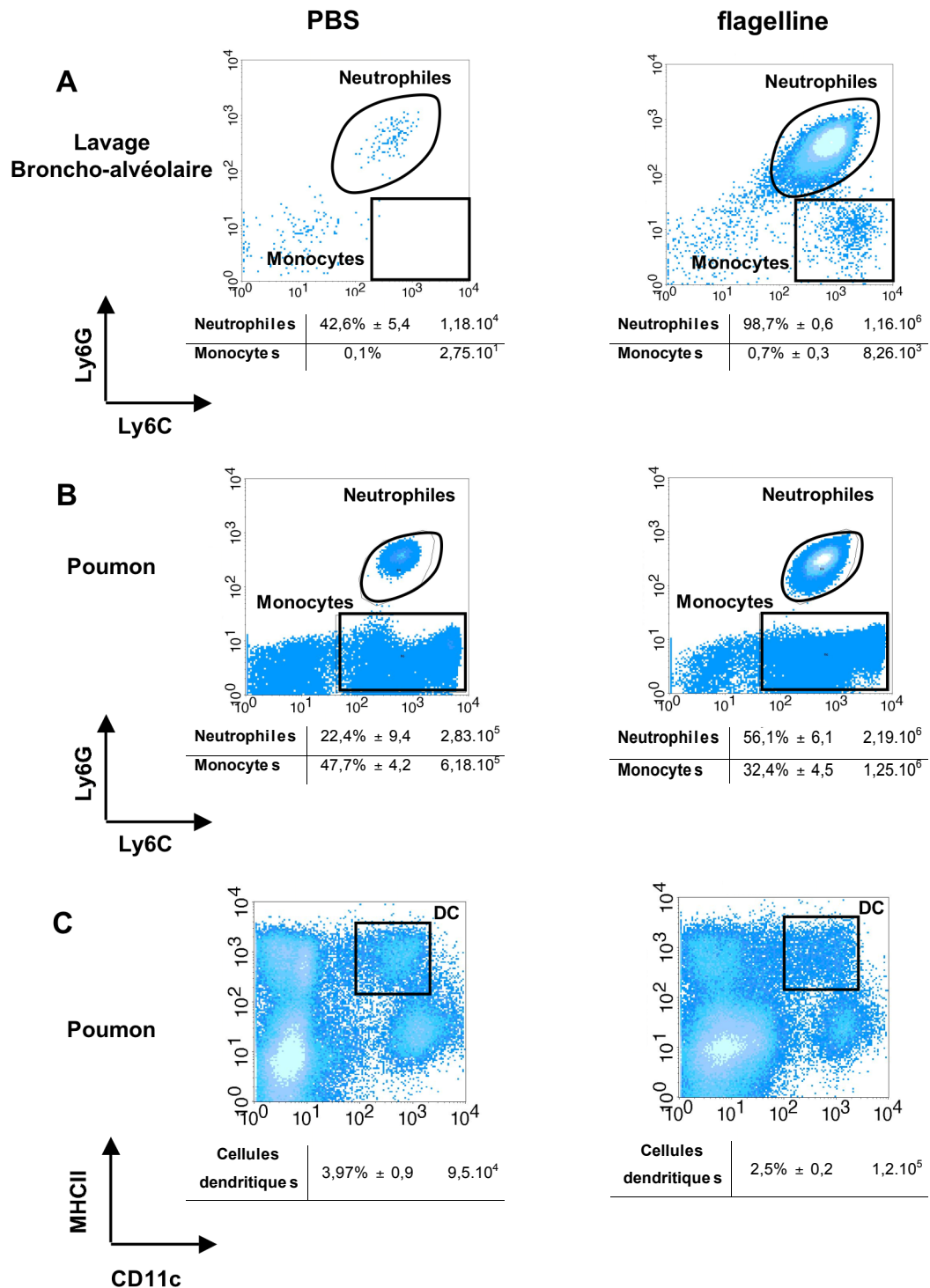


Figure 17: recrutement cellulaire induit par la flagelline dans le tractus respiratoire.

Des souris C57BL/6 (n=2-3) ont été administrées par voie intranasale avec du PBS ou de la flagelline (1 μ g). Le lavage broncho-alvéolaire et les poumons ont été prélevés 16h après le traitement et le recrutement analysé par cytométrie en flux. (A et B) Analyse des neutrophiles et des monocytes. L'expression de Ly6C et Ly6G sur les cellules CD11b⁺ du lavage broncho-alvéolaire (A) et du poumon (B) a été analysé. (C) Analyse des cellules dendritiques. L'expression de CD11c et MHCII a été analysé sur les cellules F4/80^{neg} (pour exclure les macrophages). Le pourcentage et le nombre absolu de chaque type cellulaire sont indiqués sous chaque graphique. Les valeurs correspondent à la moyenne $\pm$ l'écartype.

La flagelline mobilise les monocytes inflammatoires au niveau local et systémique.

Des études chez la souris ont mis en évidence dans le sang deux populations de monocytes en utilisant les marqueurs discriminants Ly6C et CX₃CR1 (récepteur de la chimiokine CX₃CL1 ou fractalkine) (Geissmann *et al.*, 2003). Ainsi, Les monocytes "résidents" CX₃CR1⁺Ly6C^{-int} ont principalement un rôle dans l'homéostasie des macrophages alors que les monocytes inflammatoires CX₃CR1⁺Ly6C⁺ sont mobilisés lors d'infections ou d'inflammations (Auffray *et al.*, 2009). Nous avons donc étudié la distribution de ces 2 populations de monocytes dans le sang et le poumon (Figure 18). Dans ce but, des souris chimères *Cx3cr1-EGFP*→C57BL/6J ont été utilisés pour suivre les cellules exprimant CX₃CR1. Nous avons ensuite évalué si la flagelline administrée par voie intranasale modifiait les populations de monocytes résidents vs inflammatoires dans le sang et le poumon. Dans le sang, nous avons observé une augmentation de près de 5 fois de la fréquence des monocytes inflammatoires CX₃CR1⁺Ly6C⁺, après avoir exclus les neutrophiles de l'analyse alors que la population de monocytes résidents ne semblait pas changée. Dans le poumon, la même tendance a été observée. L'administration par voie intra-nasale de flagelline augmente donc la fréquence en monocytes inflammatoires dans le sang et le poumon.

Les monocytes inflammatoires sont capables de capturer des antigènes et de se différencier en CPA de type inflammatoire en particulier sous l'effet du GM-CSF et de l'IL-4 (Auffray *et al.*, 2009). Ces cellules expriment alors à leur surface des molécules de co-stimulation (CD86) ainsi que le CMHII. Nous avons trouvé que la flagelline augmente le nombre de monocytes inflammatoires (CX₃CR1⁺Ly6C⁺) exprimant CD86 et MHCII dans les ganglions médiastinaux qui drainent le poumon. Ces cellules pourraient représenter les CPA à l'origine de l'effet adjuvant.

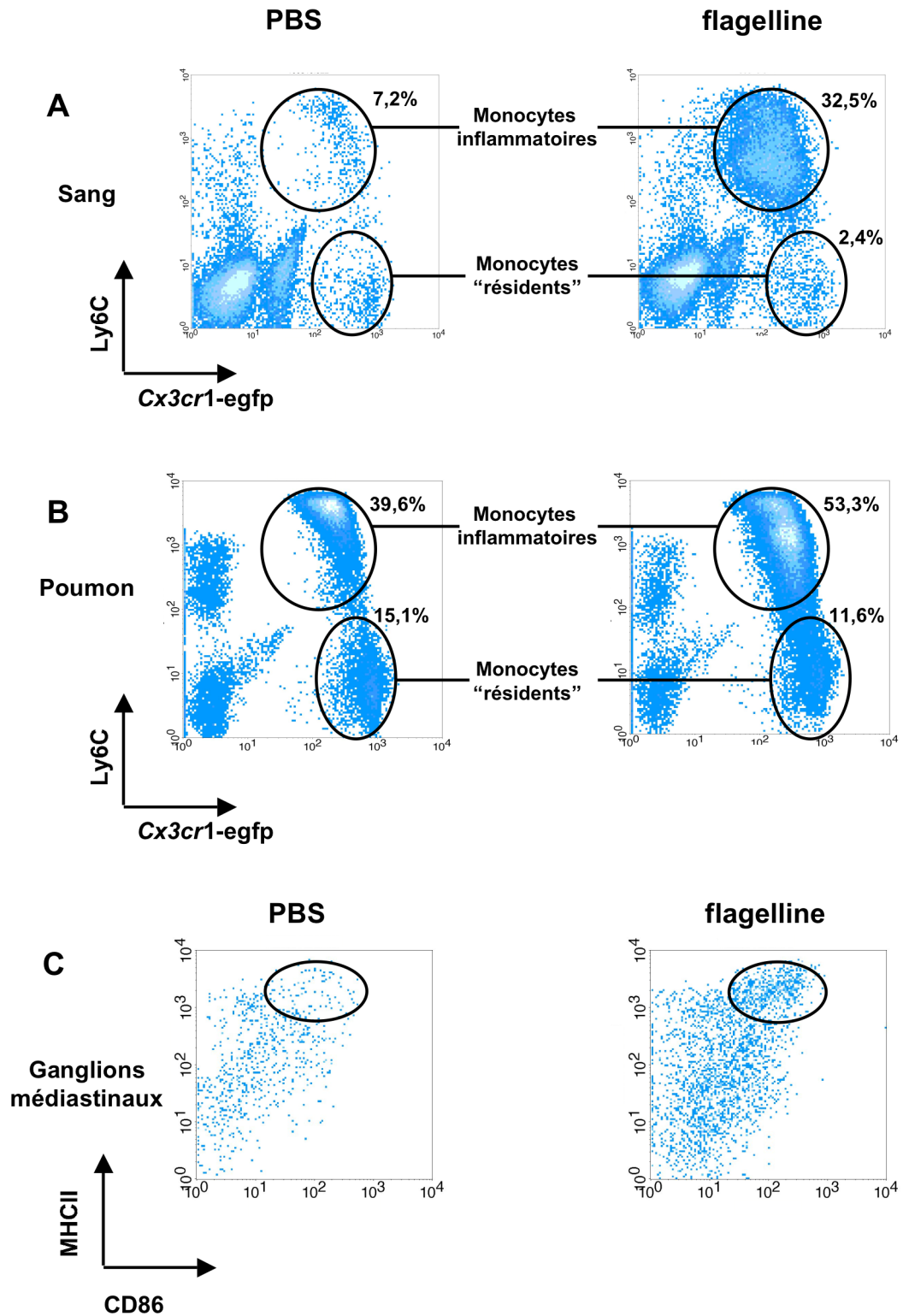


Figure 18 : Recrutement des monocytes inflammatoires en réponse à la flagelline.

Des souris chimères (*Cx3cr1-EGFP* > C57BL/6) (n=2-3) ont été administrées par voie intranasale avec du PBS ou de la flagelline (1µg). Le sang (A), les poumons (B) et les ganglions médiastinaux (C) ont été prélevés 16h après le traitement, et le recrutement cellulaire analysé par cytométrie en flux. (A et B) Les différentes populations monocytaires. La séparation est réalisée par les marqueurs Ly6C et CX3CR1 sur une population CD11b⁺Ly6G^{neg} (pour exclure les neutrophiles). (C) Activation des monocytes inflammatoires. L'activation des cellules CX3CR1⁺Ly6C⁺ a été déterminé par les marqueurs CD86 et CMHII. Les valeurs correspondent à la moyenne des pourcentages.

À la recherche des facteurs épithéliaux nécessaires à l'effet adjuvant.

Les facteurs épithéliaux responsables de l'activation de la réponse adaptative en réponse à la flagelline devraient participer au recrutement et à l'activation des CPA. Dans cette première approche, nous nous sommes intéressés aux chimiokines connues pour recruter les monocytes et les cellules dendritiques ou leurs précurseurs monocytaires. Comme décrit dans la figure 3 de l'article 2, la flagelline administrée par voie intra-nasale, active rapidement mais de façon transitoire la production de CCL20. Cette chimiokine a été initialement décrite pour son activité sur les cellules dendritiques (Dieu 1998 ; Dieu-Nosjean, 2000 ; Sierro 2001). Pour étudier la contribution de CCL20 dans l'effet adjuvant de la flagelline, des souris déficientes pour CCR6, récepteur de CCL20 ont été utilisées (Figure 19). Les souris chimères (WT→WT et *Ccr6*^{-/-}→WT ; C57BL/6J pour WT) ont été immunisées par voie intranasale avec l'ovalbumine seule (OVA), flagelline + OVA ou cholera toxine + OVA (CT) et le taux d'anticorps anti-ovalbumine a ensuite été déterminé dans le sérum pour estimer l'efficacité de l'effet adjuvant. Ces résultats indiquent que la flagelline, à l'instar de la cholera toxine, a les mêmes propriétés adjuvantes dans les chimères WT→WT et *Ccr6*^{-/-}→WT. En conclusion, CCL20 ne semble donc pas jouer un rôle déterminant dans l'effet adjuvant de la flagelline.

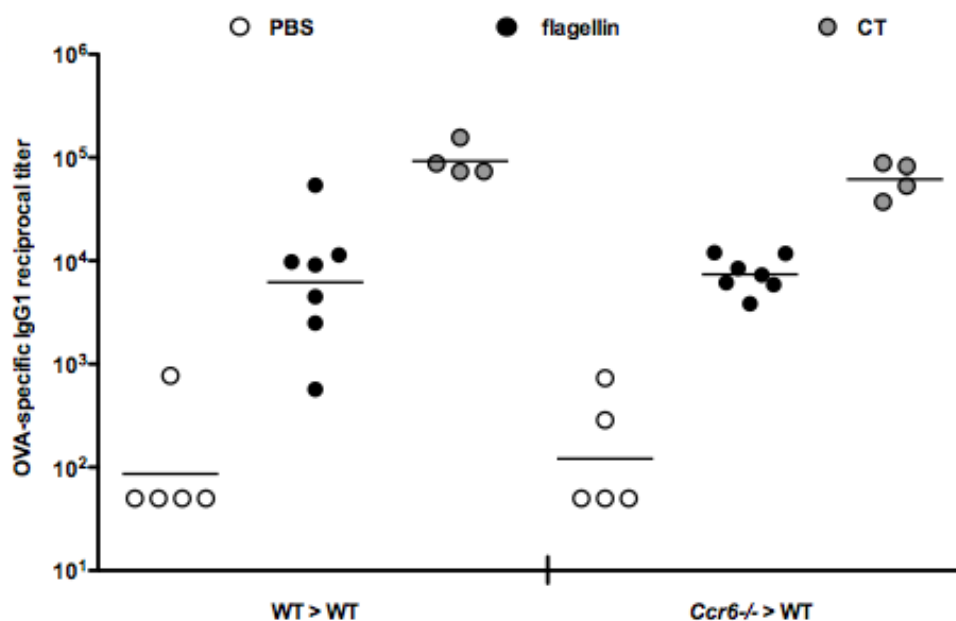


Figure 19 : L'effet adjuvant de la flagelline ne nécessite pas le récepteur CCR6 sur les cellules hématopoïétiques.

Des souris chimères (C57BL/6 > C57BL/6 (WT>WT) ou *Ccr6*^{-/-} > C57BL/6 (*Ccr6*^{-/-}>WT)) (n=4-7) ont été immunisées par voie intranasale aux jours 1 et 21 avec de l'ovalbumine supplémentée avec du PBS, de la flagelline ou de la cholera toxine (CT). Le sérum a été prélevé au jour 35 et la réponse anti-ovalbumine a été déterminée par ELISA. Le titre en anticorps anti-ovalbumine de chaque souris est représenté individuellement et la moyenne géométrique est représentée par une barre horizontale.

La contribution d'autres chimiokines spécifiques des monocytes (CCL2, CCL3 ou CCL7) a ensuite été envisagée. Nous avons déterminé leur expression pulmonaire après instillation intranasale de flagelline (Figure 20). La transcription de *Ccl2*, *Ccl3*, *Ccl7* est activée avec un pic à 8h puis régresse à 24h au niveau observé à l'homéostasie. Le rôle de CCL2, CCL3 ou CCL7 dans le recrutement et l'activation des CPA, et dans l'effet adjuvant sera à préciser dans de prochaines études.

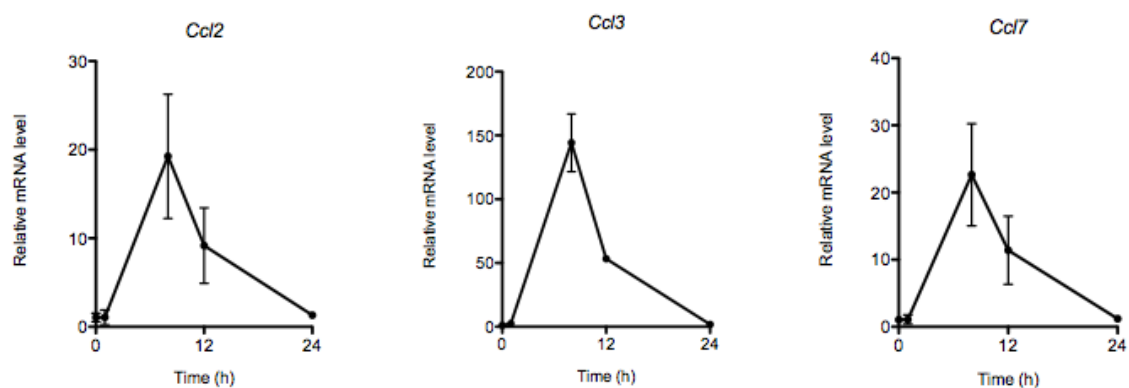


Figure 20 : Cinétique d'expression des gènes *Ccl2*, *Ccl3* et *Ccl7*.

Des souris C57BL/6 (n=2-3) ont été traitées ou non avec de la flagelline par voie intranasale. Les poumons sont prélevés à différents temps et préparés pour une analyse en qPCR. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ l'écartype.

L'administration systémique de flagelline induit une réponse innée de type Th17

Article 3

TLR5 signaling stimulates the innate production of IL-17 and IL-22 by CD3^{neg}CD127⁺ immune cells in spleen and mucosa.

Van Maele and Carnoy and Cayet et al., Journal of Immunology, 2010, 185 : 1177-1185

L'administration d'agonistes TLR dans la lumière de la muqueuse respiratoire déclenche une réponse épithéliale dont les caractéristiques majeures sont la production de (1) chimiokines pour le recrutement et l'activation de cellules de l'immunité innée comme les neutrophiles, (2) facteurs de rétrocontrôle positif et négatif de la signalisation et (3) des facteurs de croissance et de réparation. Lorsque les agents pathogènes invasifs traversent la barrière épithéliale, leur détection se fait également au niveau de la *lamina propria*. Cependant les mécanismes et les cellules impliquées dans les réponses dépendantes des TLR dans ce compartiment sont mal connus. Des études récentes ont mis en évidence la contribution des cytokines IL-17 et IL-22 dans les défenses des muqueuses (Aujla *et al.*, 2008; Ishigame *et al.*, 2009). Ces cytokines participent à l'immunité innée des muqueuses en stimulant la production épithéliale de chimiokines, de molécules de défenses et de réparation tissulaire. Notre étude a consisté à déterminer l'impact de la signalisation TLR dans la production de ces cytokines.

La flagelline, agoniste de TLR5, a donc été administrée par voie systémique pour mimer la détection d'une invasion bactérienne. Nos résultats suggèrent que la flagelline active rapidement et transitoirement, par l'intermédiaire des cellules dendritiques, la production splénique et muqueuse des cytokines IL-17 et IL-22 ainsi que de leurs gènes cibles. Dans la littérature, la source cellulaire de ces cytokines est variée incluant des cellules de l'immunité innée et adaptative (Cua et Tato, 2010). Les cellules associées à la production d'IL-17 et d'IL-22 dépendante de la flagelline sont des cellules lymphoïdes innées CD3^{neg}CD127⁺ exprimant ou non CD4. Nous proposons que ces cellules et les cytokines IL-17 et IL-22 jouent un rôle dans les défenses muqueuses en réponse à une invasion microbienne.

TLR5 Signaling Stimulates the Innate Production of IL-17 and IL-22 by CD3^{neg}CD127⁺ Immune Cells in Spleen and Mucosa

Laurie Van Maele,^{*,†,‡,§,¶,1} Christophe Carnoy,^{*,†,‡,§,¶,1} Delphine Cayet,^{*,†,‡,§,¶,1} Pascal Songhet,^{||} Laure Dumoutier,[#] Isabel Ferrero,^{**} Laure Janot,^{††,‡‡} François Erard,^{††,‡‡} Julie Bertout,[¶] Hélène Leger,^{§,§§,¶¶} Florent Sebbane,^{*,†,‡,§,¶} Arndt Benecke,^{§,§§,¶¶} Jean-Christophe Renault,[#] Wolf-Dietrich Hardt,^{||} Bernhard Ryffel,^{††,‡‡} and Jean-Claude Sirard^{*,†,‡,§,¶}

In adaptive immunity, Th17 lymphocytes produce the IL-17 and IL-22 cytokines that stimulate mucosal antimicrobial defenses and tissue repair. In this study, we observed that the TLR5 agonist flagellin induced swift and transient transcription of genes encoding IL-17 and IL-22 in lymphoid, gut, and lung tissues. This innate response also temporarily enhanced the expression of genes associated with the antimicrobial Th17 signature. The source of the Th17-related cytokines was identified as novel populations of CD3^{neg}CD127⁺ immune cells among which CD4-expressing cells resembling lymphoid tissue inducer cells. We also demonstrated that dendritic cells are essential for expression of Th17-related cytokines and so for stimulation of innate cells. These data define that TLR-induced activation of CD3^{neg}CD127⁺ cells and production of Th17-related cytokines may be crucial for the early defenses against pathogen invasion of host tissues. *The Journal of Immunology*, 2010, 185: 1177–1185.

Toll-like receptors are key players in innate immunity and are essential for sensing microbial components and triggering the host defense (1). At the luminal interface, the TLR response is mediated by the epithelium and mainly consists of neutrophil recruitment and activation (2). After microbes cross the epithelium, sensing occurs within the lamina propria. However, the nature of the TLR-mediated innate cells and defense factors that are triggered by microbial desequstration has yet to be defined.

Recent studies highlighted the contribution of IL-17A, IL-17F, and IL-22 to defensive reactions within the mucosa (3–6). These cytokines help orchestrate innate immunity by stimulating epithelial cells to produce defense molecules, matrix proteases, and tissue repair molecules (7, 8). The source of IL-17A, IL-17F, and IL-22 varies. During an adaptive response, the lymphocytes that differentiate into Th17 cells are the main producers of cytokines (9). IL-17A can rapidly be produced during innate responses to bacteria or microbial molecular patterns by $\gamma\delta$ T lymphocytes in a TLR4-dependent manner, NKT cells activated with α -galactosylceramide, or lymphoid tissue inducer (LTi)-like cells following stimulation with the TLR2/Dectin-1 agonist zymosan (10–12). NK-like and LTi-like innate lymphocytes expressing IL-7R α , Nkp46, the transcription factor ROR γ t, and eventually CCR6 are sources of IL-22 and/or IL-17 in mucosa under steady-state conditions (13–18). Interestingly, microbial flora-colonizing mucosa are required to switch on lasting IL-17 and IL-22 production (15, 17). In absence of these innate lymphocytes, infectious colitis is exacerbated, suggesting an operational role of IL-22 and IL-17 in the gut's innate immunity (15, 17). However, the link between TLR-mediated signaling, Th17-related cytokine production by innate immune cells, and mucosal defenses has not been defined.

The ability of TLR5 signaling to induce mucosal production of IL-17 and IL-22 and thereby promote antimicrobial defense has never been investigated. TLR5 detects flagellins—the main protein of bacterial flagella (19). Flagellins are expressed by bacteria, particularly pathogenic bacteria, in the gut and the lung and activate epithelial TLR5 signaling (19–21). Flagellin expression is switched off as soon as bacteria translocate into the lamina propria (22). Detection of flagellin molecules represents therefore an alarm signal for subepithelial invasion and/or disruption of the epithelial barrier function. TLR5 signaling is rapidly induced in the lamina propria dendritic cells (DCs) of the small intestine (23). In the current study, we show that flagellin activates (via DCs) the splenic and mucosal production of IL-17 and IL-22 and the subsequent expression of target genes. This TLR5-mediated response was associated with a unique population of immune cells express-

*Institut Pasteur de Lille, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille; [†]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 1019; [‡]Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 8204; [§]Université Lille Nord de France; [¶]Institut de Recherche Interdisciplinaire, Centre National de la Recherche Scientifique Unité de Service et de Recherche 3078; ^{||}Institut Fédératif de Recherche 142, Lille; ^{§§}Institut des Hautes Études Scientifiques, Bures-sur-Yvette; ^{††}University of Orléans and ^{‡‡}Centre National de la Recherche Scientifique Molecular Immunology and Embryology Unité Mixte de Recherche 6218, Institut de Transgenèse, Orléans, France; ^{||}Institute of Microbiology, Eidgenössische Technische Hochschule Zurich, Zurich; ^{**}Ludwig Institute for Cancer Research, Lausanne Branch, University of Lausanne, Epalinges, Switzerland; and [#]Ludwig Institute for Cancer Research, Brussels Branch, de Duve Institute, Université catholique de Louvain, Brussels, Belgium

¹L.V.M., C.C., and D.C. contributed equally to this work.

Received for publication January 15, 2010. Accepted for publication May 11, 2010.

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (to C.C., L.V.M., D.C., and J.-C.S.), the Institut Pasteur de Lille, the Université Lille Nord de France, and the Région Nord Pas de Calais (ARCir Europe). W.-D.H. and J.-C.S. are funded by the European Community (Grant INCO-CT-2006-032296).

Microarray data were deposited in the publicly available database (<http://mace.ihes.fr>) with accession number 2844328654.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Jean-Claude Sirard, Center for Infection and Immunity of Lille, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 1019, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 8204, Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Professeur Calmette, 59019 Lille Cedex, France. E-mail address: jean-claude.sirard@inserm.fr

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this paper: Ct, cycle threshold; DC, dendritic cell; DTX, diphtheria toxin; γ_c , common γ -chain; LTi, lymphoid tissue inducer; ns, nonsignificant; WT, wild-type.

Copyright © 2010 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/10/\$16.00

ing CD127 but not CD3 that resembles LT α i cells, LT α i-like, or NK-like innate lymphocytes. Our findings suggest that CD3^{neg}CD127⁺ innate immune cells may be instrumental to the host's mucosal defense through the early production of Th17-related cytokines.

Materials and Methods

Mice

Specific pathogen-free mouse strains C57BL/6J, C57BL/6J-Ly5.1, BALB/c, and *Tcrb*^{-/-}, *Tcrd*^{-/-}, *Tcrb*^{-/-}*Tcrd*^{-/-}, *Tlr5*^{-/-} (24); *Myd88*^{-/-} (25); transgenic animals for pre-TCR α , *Cd11c-DTR-EGFP* (*Itagx-DTR/EGFP*) (26); *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} backcrossed on C57BL/6J mice; *Cd1d*^{-/-} backcrossed on BALB/c background; and C.B-17 *scid* (SCID) mice were purchased from Charles River Laboratories (Wilmington, MA), The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME), or Janvier (St. Berthevin, France) or bred in an accredited establishment (number A59107; Institut Pasteur de Lille, Lille, France; Transgenose Institute Centre National de la Recherche Scientifique, Orleans, France; RCHCI at Eidgenössische Technische Hochschule Zurich, Zurich, Switzerland; Ludwig Institute for Cancer Research, Brussels, Belgium; and Ludwig Institute for Cancer Research, Lausanne, Switzerland). Animals (6–16 wk old) were used according to national regulations and ethical guidelines.

For bone marrow (BM) chimera, recipient mice were irradiated (1000–1500 rad) and reconstituted 2–24 h later with BM cells (4–20 $\times$ 10⁶ cells i.v.). These mice were used at 10–16 wk posttransplantation, and the degree of chimerism was assessed by measuring CD45.1 and CD45.2 surface expression by leukocytes. The current protocol yielded 96.7% reconstitution for *Cd11c-DTR/EGFP*→C57BL/6 (wild-type [WT]) in spleen and 98.2% for *Tlr5*^{-/-}→WT and 97.2% for WT→*Tlr5*^{-/-} in lung. Depletion of CD11c⁺ cells was achieved by injecting i.p. diphtheria toxin (DTX) as described previously (26). Depletion of $\gamma\delta$ T cells (~90% depletion) and NK cells (~72% depletion) was performed by injecting i.p., 24 h prior to flagellin treatment, 100 μ g mAb specific for TCR δ -chain (GL3 clone) or NK1.1 (PK136) or irrelevant mAb HB152 as control.

Flagellin administration

LPS-depleted flagellin FlC from *Salmonella typhimurium* (5 μ g) produced as previously described (21), ultrapure LPS from *Escherichia coli* (serotype 0111:B4, 5 μ g; InvivoGen, Toulouse, France), or phosphorothioate CpG oligonucleotide (5'-TCCATGACGTTCTCTGATGCT-3', 5 μ g; Eurogentec, Angers, France) diluted in PBS were injected i.v. or i.p. to mice.

Flow cytometry and sorting

Spleens were digested with collagenase D (0.5 mg/ml; Roche, Basel, Switzerland) and DNase I (40 μ g/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) during 10 min at 37°C. Cells were stained for CD127-FITC, CD45.1-FITC, CD45.2-PE, PE-conjugated lineage-specific Abs (CD3, B220, Gr1, CD11b, and CD11c), MHCII-PE, NK1.1-PerCP-Cy5.5, CD4-APC, CD11c-APC, and CD45.1-Pacific Blue (BD Biosciences, San Jose, CA; BioLegend, San Diego, CA; and eBioscience, San Diego, CA) and sorted on a BD FACSAria.

DC culture

DCs were differentiated from BM as described previously (25). On day 7 or 11, BMDCs were stimulated for 2 h and analyzed.

Determination of cytokine production

CCL20 and IL-22 (R&D Systems, Minneapolis, MN) and IL-17A (eBioscience) levels were measured by ELISA in serum, and tissue homogenates were prepared with T-PER Reagent (Pierce, Rockford, IL) supplemented with protease inhibitors (Roche).

Gene expression

Total RNA was extracted with the Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) and reverse transcribed with the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). A preamplification of cDNA from sorted cells was performed prior to real-time PCR using the PreAmp kit (Applied Biosystems). cDNA was amplified using SYBR Green-based real-time PCR (Supplemental Table I) or commercial TaqMan assays (Applied Biosystems). For high-throughput analysis, TaqMan Low Density Arrays (Applied Biosystems) were used. Analysis was carried out using Real-Time StatMiner software (Integromics, Granada, Spain). Relative mRNA levels ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) were determined by comparing 1) the cycle thresholds (Ct) for the gene of interest and *Actb* (ΔCt) and 2) ΔCt values for treated and control groups ($\Delta\Delta Ct$). Ct upper limit was fixed to 33 cycles.

Microarrays

Total RNA (2 μ g) was processed on the Mouse Whole Genome Arrays version 2.0 (Applied Biosystems) (27). Data were analyzed using the NeONORM method, and heat maps were created as described previously (27, 28). Gene Ontology was analyzed using the Panther Protein Classification System (www.pantherdb.org).

Statistical analysis

The Mann-Whitney *U* test and the Graphpad Prism software 5.0 were used in analyses. The Limma test with Benjamini-Hochberg false discovery rate (FDR) correction was used for high-throughput PCR with TaqMan Low Density Arrays. Results were considered significant for *p* < 0.05 indicated by an asterisk. Results are expressed as arithmetic means $\pm$ SD.

Results

Systemic TLR5 signaling enhances *Il17a*, *Il17f*, and *Il22* gene expression in lymphoid tissues

To establish whether TLR stimulation promotes the rapid expression of the Th17-related cytokines, mice were treated i.p. or i.v. with a TLR4 agonist (LPS), a TLR5 agonist (flagellin), or a TLR9 agonist (CpG). Gene expression in spleen and lymph nodes was then monitored (Fig. 1A, 1B). Flagellin administration triggered within 2 h ~1000-fold increase of *Il22* mRNA levels. Similarly, *Il17a* and *Il17f* gene expression was upregulated. A TLR5-mediated, Th17-related innate response was also observed in the mediastinal and inguinal lymph nodes and, to a lesser extent, in the liver (Fig. 1, Supplemental Fig. 1). LPS was initially shown to promote *Il22* expression in many tissues (29). We found that LPS also enhanced the Th17-related innate response but to a lesser extent than flagellin did (Fig. 1A, 1B, Supplemental Fig. 1). Although TLR9-mediated signaling activated the response in lymph nodes, it was devoid of any effect in the spleen.

The flagellin-dependent response was transient and peaked at 2 h; mRNA levels returned to baseline levels after 24 h (Fig. 1C, 1D). Gene profiling showed that the expression of genes specific for TLR-, IL-17R-, and IL-22R-mediated signaling was significantly enhanced in spleen (Fig. 1E). These genes encode pleiotropic and Th17-promoting cytokines (TNF- α , IL-1 β , and IL-6), chemokines that are specific for neutrophils, monocytes, and lymphocytes (CXCL-1, -2, -5, -9, and -10), antimicrobial molecules like CAMP and HAMP, lipocalin 2, S100A9, and tissue remodeling proteases matrix metalloproteinases 3 and 13. Strikingly, the expression of chemokine CCL20, which is specific for the recruitment of DC precursors, Th17 lymphocytes, LT α i-like or NK-like cells (12, 14, 30, 31), was significantly upregulated. The transcription of the IFN- γ encoding gene was also upregulated by flagellin treatment. However, we did not observe any change in the expression of genes coding for IL-21, ROR γ t, or TGF- β (i.e., other factors involved in Th17 differentiation). As shown in Fig. 1F, IL-22 levels rose significantly in serum and spleen from flagellin-treated animals, whereas IL-17A was hardly detectable in serum but rose 3-fold in the spleen. In conclusion, TLR5 signaling in lymphoid tissues promotes the rapid production of the innate cytokines IL-17A, IL-17F, and IL-22—a pattern that resembles a Th17-related innate response.

TLR5-mediated innate responses require common γ -chain-dependent immune cells

TLR5 is expressed by monocyte/macrophage/DC lineages, NK cells, CD4⁺ lymphocytes, and radioresistant stromal cells but not B lymphocytes (25, 32–35). To define the cells involved in the early production of IL-17 and IL-22, we used BM chimera expressing or not *Tlr5* and tested their ability to respond to flagellin. As shown in Fig. 2A and 2E, TLR5-competent hematopoietic cells were required to trigger flagellin-mediated *Il17* and *Il22* gene expression. By using SCID, *pre-TCR α* animals harboring enhanced number of $\gamma\delta$

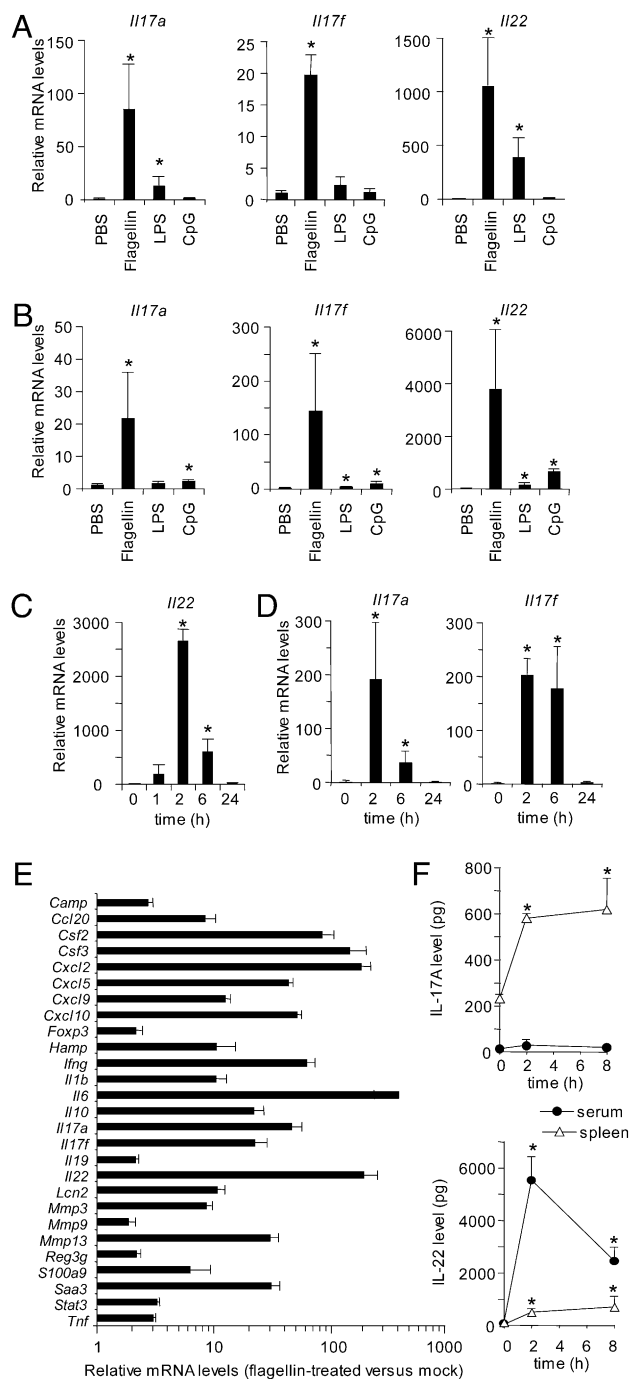


FIGURE 1. TLR5 signaling promotes a swift, transient, Th17-related response. C57BL/6 mice ($n = 3-4$) were treated i.p. or i.v. with PBS, flagellin, LPS, or CpG. Tissues were assayed 2 h later (or as indicated) for cytokine production or mRNA levels. Spleen (A) and mesenteric lymph node (B) gene expression in response to i.v. injection of TLR agonists. Kinetic analysis of transcription in mesenteric (C) and mediastinal (D) lymph nodes after i.v. flagellin injection. E, Spleen transcriptional signature after i.p. flagellin injection. mRNA levels are expressed relative to the PBS group. F, Cytokine production in spleen extract (per whole spleen) and serum (per ml) after i.p. flagellin injection. The results are representative of two to four experiments. Results are given as means $\pm$ SD. $*p < 0.05$ in Mann-Whitney U test relative to PBS group. In E, all genes display $p < 0.05$ in Limma test.

lymphocytes, $Tcrb^{-/-}$ and $Tcrd^{-/-}$ mice, we demonstrated that neither B cells nor TCR $\alpha\beta$ -/TCR $\gamma\delta$ -expressing T lymphocytes were required for flagellin-mediated *Il17* and *Il22* expression (Fig. 2B, Supplemental Fig. 2A, 2B, 2D). In contrast, the response was impaired

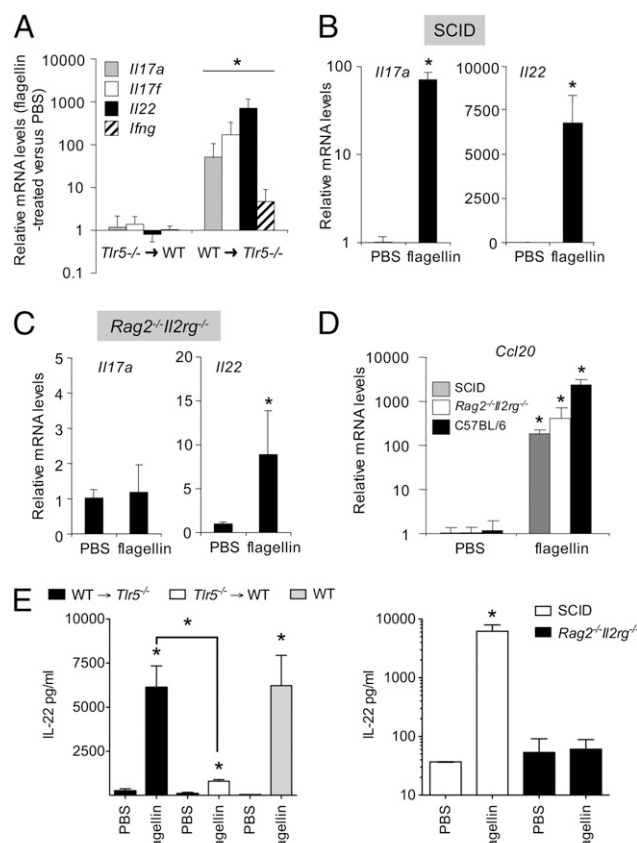


FIGURE 2. The IL receptor γ_c is required for the TLR5-mediated, Th17-related innate response. Mice ($n = 3-4$) were treated i.p. with PBS or flagellin. Lymphoid tissues and serum were sampled 2 h after injection for the quantification of mRNA levels and ELISA. A, Response in mediastinal lymph nodes from C57BL/6 (WT) $\rightarrow$ $Tlr5^{-/-}$ and $Tlr5^{-/-}$ $\rightarrow$ WT BM chimera. The spleen response in SCID (B) and $Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}$ (C) mice. D, The flagellin-mediated liver response. mRNA levels are expressed relative to the PBS group. E, IL-22 production in serum. Results are given as means $\pm$ SD. $*p < 0.05$ in Mann-Whitney U test relative to PBS group.

in $Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}$ mice that have almost normal DCs but lack B and T lymphocytes as well as NK, NKT, LT α , NK-like, and LT α -like cells, all of which depend on the IL receptor common γ -chain (γ_c) encoded by *Il2rg* gene (Fig. 2C, 2E) (12, 15, 17, 36). The impairment was not a collapse of TLR5 signaling, because the liver was still responsive to flagellin (Fig. 2D). Our experiments using genetically deficient animals and depleting Abs suggested that CD1d-restricted NKT cells or NK cells were not drivers of the TLR5-mediated response (Supplemental Fig. 2C, 2D). Therefore, our data showed that the cells expressing Th17-related cytokines after flagellin stimulation require the IL receptor γ_c for differentiation or activation but are not NK, NKT, or TCR $\gamma\delta$ -expressing innate lymphocytes.

CD3^{neg}CD127⁺ LT α -like cells produce IL-17 and IL-22 in response to TLR5 signaling

We next sought to determine which γ_c -dependent innate immune cells are involved in TLR5-mediated response. Recent work has suggested that innate lymphocytes expressing IL-7R (i.e., the CD127 or IL-7R α -chain and the CD132 or γ_c) and LT α /NK cell markers are sources of IL-22 and IL-17 (12–17). To determine whether innate immune cells produce Th17-related cytokines, splenic cells from mock- and flagellin-treated animals were sorted on the basis of lineage markers (CD11b, CD11c, Gr1, CD3, and B220), NK1.1, CD4, and CD127 (Fig. 3A). After TLR5 stimulation, Lin^{neg}NK1.1^{neg}CD127⁺CD4^{neg} and Lin^{neg}NK1.1^{neg}CD127⁺

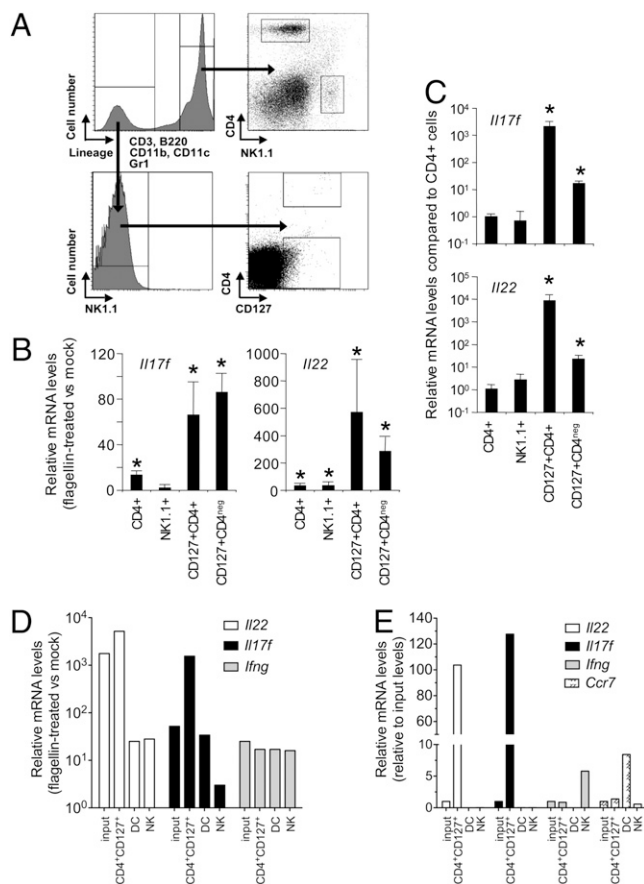


FIGURE 3. Lin^{neg}CD127⁺ innate cells upregulate *Il17* and *Il22* expression following TLR5 stimulation. C57BL/6 (A–C) or SCID (D, E) mice ($n = 3$ –4) were treated i.p. with PBS or flagellin. Spleens were sampled after 2 h for cell sorting and quantification of mRNA levels. A, Sorting scheme. Cells were sorted as Lin⁺CD4⁺, Lin⁺NK1.1⁺, and Lin^{neg}NK1.1⁺CD127⁺CD4⁺ cells and Lin^{neg}NK1.1⁺CD127⁺CD4^{neg} cells. B, Regulation of *Il17f* and *Il22* expression following flagellin stimulation. mRNA levels and statistical significance are expressed relative to PBS. C, Levels of transcripts in sorted cells following flagellin stimulation. mRNA levels and statistical significance are expressed relative to Lin⁺CD4⁺ cells. The data correspond to the mean of three independent sorting. Results are given as means $\pm$ SD. $*p < 0.05$ in Mann-Whitney *U* test. D and E, Spleen cells were used such as (input) or sorted as CD3^{neg}CD4⁺CD127⁺, DC (CD11c⁺MHCII⁺), or NK (NKp46⁺). In D, mRNA levels in flagellin-treated animals are expressed relative to PBS. In E, mRNA levels are expressed relative to input cells.

CD4⁺ cells were found to strongly upregulate *Il17f* and *Il22* expression ~ 80 - and 500 -fold, respectively (Fig. 3B). These subsets account for ~ 0.5 – 1% of Lin^{neg}NK1.1⁺ cells and 0.02 – 0.1% of splenocytes in a C57BL/6 mouse. Similar observations were done using CD3^{neg}CD4⁺CD127⁺ cells from SCID mice (Fig. 3D). Both subsets were found to express CD45, indicating a hematopoietic origin and their classification as immune cells (Supplemental Fig. 3A). We also found that the CD3^{neg}CD127⁺CD4⁺ and CD3^{neg}CD127⁺CD4^{neg} cells are mostly absent in the *Rag2*^{−/−}*Il2rg*^{−/−} mouse (Supplemental Fig. 3D). This is consistent with previous observations (12, 17). In spleen, the frequency of Lin^{neg}NK1.1⁺CD127⁺CD4⁺ matched the number of LT α cells (12, 37). We also detected upregulation of *Il22* transcript levels in CD4 lymphocytes (Lin⁺CD4⁺) and NK cells (Lin⁺NK1.1⁺) after flagellin administration. However, the Lin^{neg}NK1.1⁺CD127⁺CD4⁺ cells were the most potent producers, because *Il17f* and *Il22* mRNA levels were 100 – 1000 -fold higher in this population than in Lin^{neg}NK1.1⁺CD127⁺CD4^{neg}, CD4⁺, or NK cells (Fig. 3C). Like the NK-like or LT α -like cells, Lin^{neg}NK1.1⁺CD127⁺CD4⁺ innate lymphocytes

express *Ccr6*, but we were unable to detect any mRNA for *Rorc* or *Ncr1* encoding ROR γ t and NKp46. In addition, we observed that, upon flagellin stimulation, *Ifng* expression was mainly upregulated in NK cells rather than Lin^{neg}CD127⁺ cells (data not shown). Our data provide evidence that Lin^{neg}CD127⁺ innate immune cells, and especially the CD4⁺ fraction, which resembles LT α cells, can rapidly produce IL-17 and IL-22 cytokines following TLR activation.

TLR5-mediated activation of Th17-related innate responses requires DCs

To determine whether the TLR5-mediated upregulation of Th17-related innate response is a direct innate lymphocyte activation process or requires DC stimulation, DTX-mediated ablation of CD11c⁺ cells was performed in a *Cd11c-DTR-EGFP* BM chimera. The DTX treatment depleted $93.8 \pm 2.2\%$ of CD11c⁺MHCII^{high} DCs (Fig. 4A). In addition, we found that DTX treatment did not eliminate the CD3^{neg}CD4⁺CD127⁺ cells in the spleen of a *Cd11c-DTR-EGFP* chimera and did not alter the TLR5-mediated production of IL-22 (Supplemental Fig. 3). As shown in Fig. 4B, systemic administration of flagellin to DC-depleted animals resulted in impaired *Il17f* or *Il22* transcription, compared with controls. Thus, our experiments demonstrated that DCs are necessary for TLR5-mediated expression of Th17-related cytokines.

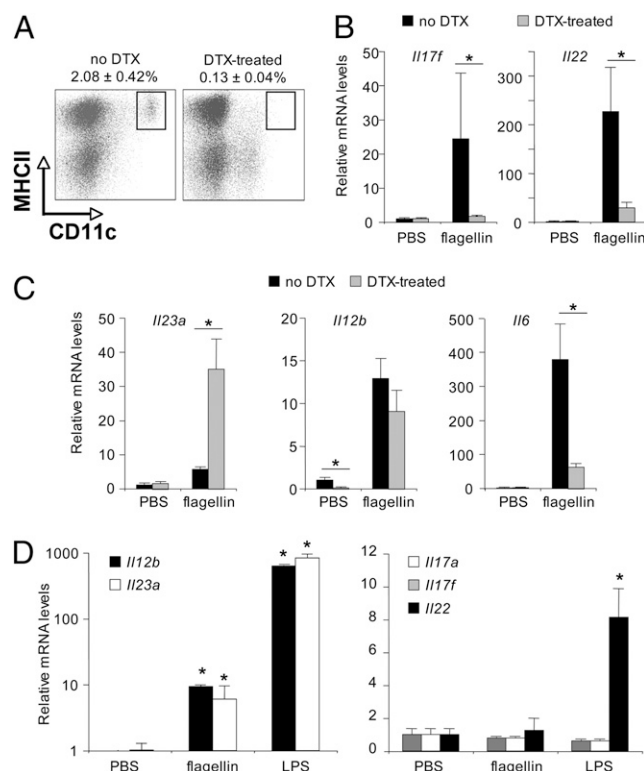


FIGURE 4. DCs regulate TLR5-dependent, Th17-related innate responses. *Cd11c-DTR-EGFP*→C57BL/6 chimera mice ($n = 4$) were injected i.p. with 100 ng DTX or untreated (no DTX). A, Depletion of splenic DCs was assessed 24 h later by flow cytometry. B and C, The flagellin-specific transcriptional response. Twenty-four hours after DTX injection, mice were treated i.p. with PBS or flagellin. Spleen was sampled after 2 h for the quantification of transcripts specific for Th17-related cytokine genes (B) and DC-specific cytokine genes (C). mRNA levels are expressed relative to the PBS→no DTX group. D, BM-derived DCs from C57BL/6 mice were treated or not with LPS or flagellin ($1 \mu\text{g/ml}$) for 2 h, and mRNA levels were determined relative to mock DCs. Statistical significance was expressed relative to no DTX (B, C) or relative to the mock DCs (D). Results are given as means $\pm$ SD. $*p < 0.05$ in Mann-Whitney *U* test.

Th17 differentiation depends on tissue-derived TGF- β and IL-1 β , and IL-6 produced by DCs and the maintenance of Th17 phenotype have been associated to DC-derived IL-23 (9). In vivo, DC cell ablation was found to attenuate the upregulation of *Il6* transcription in response to flagellin (Fig. 4C). We did not observe any alteration in *Il1b*, *Il12b* coding for the p40 chain of IL-12 or IL-23, and *Tgfb* gene expression (data not shown). Intriguingly, *Il23a* (coding for the p19 chain of IL-23) transcription was enhanced by DTX treatment; it is possible that CD11c^{low}MHCII^{neg} cells having infiltrated the spleen in DTX-treated mice support *Il23a* upregulation (Fig. 4A, 4C). In this study, we found that flagellin promoted the expression of both *Il12b* and *Il23a* in BM-derived DCs (Fig. 4D). In response to flagellin, DCs can therefore produce both IL-6 and IL-23, with the subsequent expression of an innate, Th17-related signature. However, in vivo, IL-23 alone appears unable to induce gene activation. In response to flagellin, DC-mediated IL-6 production could therefore promote the Th17-related signature by Lin^{neg}CD127⁺ cells.

Previous studies suggested that DCs produce IL-22 (4, 38). In this study, we found that flagellin promoted the expression of *Il12b* in BM-derived DCs but did not have any effect on *Il17a*, *Il17f*, and *Il22* transcription (Fig. 4D). LPS, which strongly increased *Il12b* and *Il23a* transcription, did not upregulate expression of *Il17a* and *Il17f* in DCs but did enhance *Il22* mRNA levels ~8-fold, compared with untreated cells. Analysis of transcription in splenic DCs sorted from mice treated with flagellin also showed that DCs were not potent source of IL-22 (Fig. 3D, 3E). Taken as a whole, our data suggested that DCs are not a major source of TLR5-mediated, Th17-related cytokine production but contribute to induction of the latter.

TLR5 signaling triggers an intestinal, Th17-related, innate response

Because Th17-related cytokines are important in the control of inflammation and infection in the mucosa (3–6, 38, 39), we next assessed the impact of flagellin administration on intestinal tissues. Flagellin strongly enhanced the production of IL-22 within 2 h of administration from the duodenum to the proximal colon; the level then returned to the baseline at 8 h (Fig. 5). CCL20 synthesis was also strongly induced in the small intestine (Supplemental Fig. 4A). In contrast, gut IL-17A production changed moderately following flagellin treatment. In any intestine segments, TLR5 signaling strongly enhanced transcription of the *Il17* and *Il22* genes and those encoding antimicrobial peptides, neutrophil-specific chemokines and growth factors, and tissue remodeling/repair molecules (Fig. 5C, Supplemental Fig. 4B–E). A similar pattern was also observed in lung tissue, but regression to baseline levels was not observed at 8 h, suggesting that the kinetic may be different in the respiratory tract (Supplemental Fig. 5). In conclusion, systemic flagellin administration promotes mucosal Th17-related innate responses.

We used the same type of analysis than for the response in spleen and lymph nodes to investigate the effects of flagellin on mucosa. The gut and pulmonary flagellin-mediated Th17-like innate response was stronger in WT $\rightarrow$ *Tr5*^{−/−} than in *Tr5*^{−/−} $\rightarrow$ WT animals (Fig. 5D, Supplemental Fig. 5). These findings indicated that TLR5-competent hematopoietic cells are also instrumental in the mucosal response. DC depletion impaired the upregulation of the intestinal Th17-related signature (Supplemental Fig. 4F). Last, we compared Th17-related gene expression in *Rag2*^{−/−}*Il2rg*^{−/−} and WT animals (Fig. 5E). As previously reported, steady-state levels of *Il22*, *Il17*, and *Ifng* transcripts in the ileum were significantly lower in *Rag2*^{−/−}*Il2rg*^{−/−} than in WT animals (17). After TLR5 stimulation, transcription of these genes was not enhanced in the *Rag2*^{−/−}*Il2rg*^{−/−} intestine. Taken as a whole, our data suggest

that TLR5 signaling elicits a mucosal Th17-related response by innate immune cells that require the γ_c and help from DCs.

Finally, the expression of many genes was upregulated in the gut of *Rag2*^{−/−}*Il2rg*^{−/−} animals, suggesting that TLR5 signaling promotes the activation of non-lymphoid cells (Fig. 5E). Experiments with the *Tr5*^{−/−} chimera reinforced these conclusions because radioresistant cells, likely structural/stromal cells, contributed to TLR5-mediated responses, especially in lung tissue (Fig. 5D, Supplemental Fig. 5).

The flagellin-induced transcriptional signature has features of Th17- and TLR-mediated responses

To further characterize the response to flagellin, we performed a microarray time course analysis of gene expression in the distal ileum of treated mice. Biological processes including signaling and defense pathways, cytokine- and chemokine-mediated immunity, NF- κ B signaling, granulocyte- and macrophage-mediated immunity, cell proliferation and differentiation, and apoptosis, were significantly modulated 2–8 h after flagellin administration (Supplemental Fig. 6, Supplemental Table II). On the basis of these data, we arbitrarily defined five groups of genes according to their potential role in the gut immune response (Table I). The first group of genes encodes modulators of IL-17 an IL-22 production as well as differentiation of Th17, LTi, LTi-like, NK, and NK-like cells. The second class was involved in the positive or negative transcriptional control of IL-17R (i.e., C/EBP β and C/EBP δ), IL-22R (i.e., SOCS-1, SOCS-3, and STAT5A) and TLR (i.e., activating transcription factor 3 and I- κ B α) signaling. The third group includes TLR, IL-17R, and IL-22R signaling target genes coding for antimicrobial molecules or factors regulating epithelium barrier function. Interestingly, our analysis also identified antiviral genes. In contrast to previous studies of Th17 cytokine-mediated signaling, we did not find any transcriptional modulation of the mucin and β -defensin genes. The fourth group corresponds to genes encoding factors involved in recruitment, development, or function of various immune cells. Relative to controls, chemokines specific for innate immune cells like neutrophils, NK, NKT, or LTi cells, T and B lymphocytes, or monocytes were significantly enriched—suggesting that several cell types may enter the tissues and participate in the immune response. The last group includes genes required for TLR4 or TLR2 signaling (i.e., LBP, CD14, and MAL). In conclusion, intestinal gene expression profiling showed that flagellin promotes a transient immune response involving regulators and effectors of both TLR- and Th17-mediated immunity.

Discussion

The way in which TLR signaling activates the host's innate defenses during mucosal invasion by pathogens is subject to debate. In the current study, we showed that TLR5 signaling induces systemic and mucosal innate expression of the Th17-related IL-17 and IL-22 cytokines by stimulating Lin^{neg}CD127⁺ cells in a DC-dependent manner. Overall, our data suggest that Lin^{neg}CD127⁺ cells may play a major role as innate lymphocytes in the early orchestration of a TLR-dependent, protective response to mucosal invasion by pathogens.

Th17-related cytokines contribute to adaptive immunity in response to various inflammatory and infectious diseases (5, 6, 30, 39); however, their impact on the early phase of infection is poorly understood. The effect of TLR signaling on IL-17 and IL-22 was previously suggested because their synthesis was enhanced after administration of TLR2 and TLR4 agonists (12, 29). Very recently, TLR5 signaling was also associated to such response (40). In this study, we analyzed the immune response to the TLR5 activator

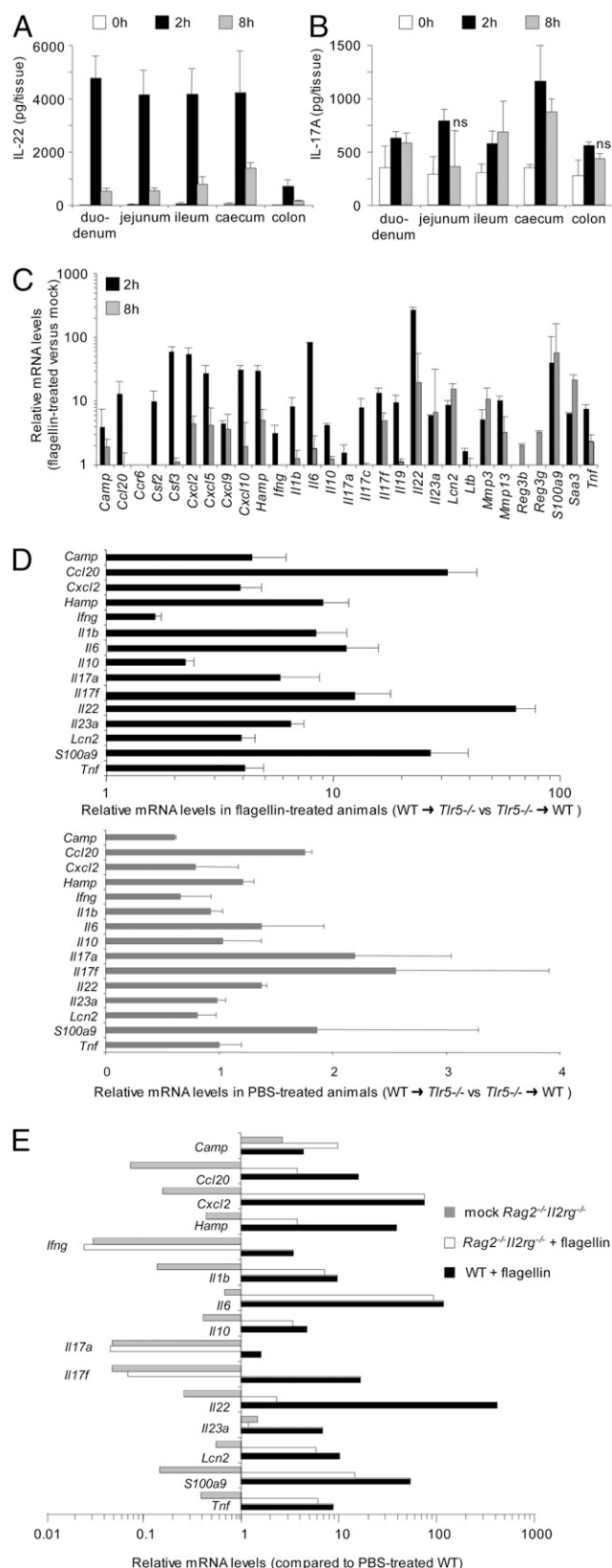


FIGURE 5. TLR5 signaling promotes γ_c -dependent, Th17-related innate responses in the gut. Mice ($n = 3-4$) were treated i.p. with PBS or flagellin, and gut segments (5 cm for proximal duodenum, jejunum, and distal ileum; 3 cm for proximal colon and the whole cecum) were sampled at the indicated times for quantification of cytokine production and mRNA levels. **A** and **B**, Cytokine production in C57BL/6 (WT) animals. Tissue segments were homogenized within 1 ml lysis buffer. The results are representative of two experiments. **C**, Time course analysis of the transcriptional response in

flagellin, with a focus on mucosa. Our rationale was that because flagellin expression is specifically restricted to luminal compartment, its desequestration is likely to be an alarm signal for mucosal invasion (22). We found that systemic flagellin administration promotes the swift, intense, transient production of IL-17A, IL-17F, and IL-22 and factors controlling Th17 differentiation. For example, flagellin modulates expression of the genes coding for the aryl hydrocarbon receptor repressor, the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like factor ARNTL and the activating transcription factor-like factor BATF—all of which are involved in Th17 differentiation (41, 42). Moreover, the flagellin-induced innate response and the Th17 adaptive response share many effectors, such as chemokines, antimicrobial peptides, antiapoptotic factors, and tissue remodeling factors. Therefore, we hypothesized that flagellin-mediated response enables the rapid and transient recruitment of systemic and mucosal defenses.

Our results suggest that the $\text{Lin}^{\text{neg}}\text{CD127}^+$ cells, especially the CD4^+ fraction, have a pivotal role in the TLR-mediated response via the production of IL-17 and IL-22. These cells are similar to LT α ($\text{CD3}^{\text{neg}}\text{CD127}^+\text{CD4}^+$), LT α -like ($\text{ROR}\gamma^+\text{Lin}^{\text{neg}}\text{CD127}^+\text{CD4}^+$), and NK-like ($\text{ROR}\gamma^+\text{NKp46}^+\text{Lin}^{\text{neg}}\text{CD127}^+\text{NK1.1}^{+/neg}$) cells (12, 14–17). LT α -like/NK-like cells constitutively produce Th17-related cytokines in a process that depends on gut flora, γ_c , and $\text{ROR}\gamma^+$ (15, 17). Moreover, the LT α -like cells were shown to upregulate the production of IL-17 and IL-22 in response to microbial products. The development of $\text{Lin}^{\text{neg}}\text{CD127}^+\text{CD4}^+$ and $\text{Lin}^{\text{neg}}\text{CD127}^+\text{CD4}^{\text{neg}}$ cells identified in this study requires the γ_c . These subsets also express the CCR6 but not the NKp46 encoding gene, suggesting a common ontogeny with LT α and LT α -like cells (12, 13). We were unable to detect any expression of $\text{ROR}\gamma^+$ in the $\text{Lin}^{\text{neg}}\text{CD127}^+$ cells; expression below our assay's detection threshold is one possible explanation for this failure. Furthermore, *Rorc* expression was downregulated in gut after flagellin injection. Interestingly, we noted enhanced intestinal expression of the gene encoding NFIL3—a factor that is essential for NK cell development (43). Recent studies demonstrated that increased expression of IL-7 enhances the number of LT α cells (37) and that deficiency in IL-7 affects the number of NK-like IL-22 expressing population (44). Additional work will be needed to define the ontogeny and transcriptional factors involved in the differentiation of $\text{Lin}^{\text{neg}}\text{CD127}^+$ cells.

DCs have an important role in integrating microbial signals and activating immune cells like Th17 lymphocytes (9). When DCs were depleted, the Th17-related innate response to flagellin was impaired, indicating that DCs are necessary for the activation of $\text{Lin}^{\text{neg}}\text{CD127}^+$ cells. Similarly, transcription of *Il6* was attenuated, which suggests that, in Th17 differentiation, DC-derived IL-6 like may contribute to $\text{Lin}^{\text{neg}}\text{CD127}^+$ cell activation (9). Our findings suggested that IL-1 β , IL-23, or TGF- β (or at least the amounts produced by DCs) are not required for $\text{Lin}^{\text{neg}}\text{CD127}^+$ cell activation. However, IL-23 might be important for an alternative activating pathway for production of IL-17 or IL-22 by LT α -like and NK-like cells because 1) cells are activated in vitro by supplementing the culture medium with IL-23 and 2) $\text{CD3}^{\text{neg}}\text{CD4}^+$

WT distal ileum. **D**, Contribution of TLR5 signaling in the hematopoietic compartment is essential for the Th17-related signature. mRNA levels 2 h after flagellin treatment are expressed as $\text{WT} \rightarrow \text{Tlr5}^{-/-}$ relative to $\text{Tlr5}^{-/-} \rightarrow \text{WT}$ mice. **E**, Contribution of the γ_c to intestinal response. mRNA levels are expressed relative to PBS-treated WT mice. In **A**, **B**, and **D**, all data displayed statistically significant changes, except where denoted as “ns” for “nonsignificant.” Results are given as means $\pm$ SD. Mann-Whitney *U* test relative to PBS group was used in **A** and **B**. Limma test was used in **C–E**.

Table I. Flagellin-induced gene expression in the ileum displays signatures that are reminiscent of Th17- and TLR-mediated responses

Group	Genes	Expression		Contribution to
		2 h	8 h	
I	<i>Ahr</i>	—	§	Transcriptional regulation of <i>IL-22</i> gene
	<i>Arntl</i>	o	—	Transcriptional regulation of <i>IL-22</i> gene
	<i>Batf</i>	+	o	Master regulation of Th17 differentiation
	<i>Il1b, Il6, Il1r1, Tnfrsf15</i>	+	o	Activation of Th17 differentiation
	<i>Il17f, Il22</i>	+	+	Th17 cell phenotype
	<i>Nfil3</i>	+	+	Regulation of NK cell differentiation
	<i>Pparg</i>	o	—	Inhibition of Th17 differentiation
	<i>Rorc</i>	—	—	Master regulation of Th17, Treg, LTi, LTi-, and NK-like cell differentiation
II	<i>Atf3, Irf5, Map3k8, Nfkb1</i>	+	o	Activation of IL-17R and TLR signaling
	<i>Cebpb, Cebpd</i>	+	+	Activation of IL-17R signaling
	<i>Dusp1, Nfkb1a, Nfkbie, Zfp36</i>	+	o	Repression of IL-17R and TLR signaling
	<i>Irf4</i>	+	+	Activation of IL-17R and TLR signaling
	<i>Socs1, Socs3</i>	+	+	Activation of IL-22R signaling
	<i>Stat5a</i>	+	o	Activation of IL-17R and IL-22R signaling
III	<i>Adm, Areg, Ereg, Nrg1, Sprr1a, Sprr2i, Tff2</i>	+	+	Epithelial barrier function
	<i>Bcl3, Birc3</i>	+	o	Inhibitor of apoptosis
	<i>Hamp, lipocalin 2, S100a8, S100a9</i>	+	+	Antimicrobial activity
	<i>Isg15, Isg20, Oas2, Oas3</i>	+	+	Antiviral activity
	<i>Ncf1, Nox1, Sod2</i>	+	o	Antimicrobial activity via superoxides
	<i>Retna, Retng</i>	+	o	Inflammation control
	<i>Rnase1, S100a11</i>	+	+	Antimicrobial activity?
	<i>Saa2</i>	o	+	Acute phase protein
	<i>Saa3</i>	+	+	Acute phase protein
	<i>Serpine1, Serpina3g, Timp1</i>	+	+	Inflammation control
	<i>Adamts4, Adamts3, Adamts8</i>	+	o	Tissue remodeling
	<i>Ccl2, Ccl3, Ccl4</i>	+	+	Monocyte recruitment
	<i>Ccl17, Ccl22</i>	+	o	T cell recruitment
	<i>Cxcl1, Cxcl2, Cxcl5</i>	+	+	Granulocyte recruitment
	<i>Ccl7, Cxcl9, Cxcl10, Cxcl11</i>	+	o	Immune cells recruitment
IV	<i>Cxcl13</i>	o	+	B and LTi cell recruitment
	<i>Ifng, Ifn-regulated genes</i>	+	o	Activation of immunity
	<i>Ltb</i>	+	o	Lymphotoxin β receptor signaling in stromal cells
	<i>Mmp3, Mmp13</i>	+	+	Tissue remodeling
	<i>Tnfrsf1a, Tnfrsf1b</i>	+	o	TNFR1 and TNFR2 signaling
	<i>Vcam1</i>	+	+	LTi-mediated organization of lymphoid tissues
	<i>Cd14</i>	+	+	LPS binding and TLR4 signaling
	<i>Lbp</i>	o	+	LPS binding and TLR4 signaling
	<i>Mal</i>	o	+	Activation of TLR2 and TLR4 signaling
	<i>Tlr2, Pglypr1</i>	+	o	Bacterial cell wall signaling
V				

Microarray gene expression data from the distal ileal segments of mice ($n = 3$) treated i.p. with flagellin for 2 and 8 h were compared with data from mock animals in a time course analysis. All genes differentially expressed and the corresponding method and annotation are included as Supplemental Fig. 5 and Supplemental Table II.

o, similar expression relative to mock animals; +, upregulation relative to mock animals; —, downregulation relative to mock animals; §, data from a comparison between mock and 2-h flagellin-treated animals.

cells express IL-23R (12, 13, 15, 45). In the intestine, TLR5 signaling activates lamina propria DCs, which then promote Th17 differentiation (23). In contrast, intestinal DCs do not respond to TLR4 stimulation (23, 46). Flagellin treatment enhanced the transcription of the genes coding for CD14, LPB, MAL, and TLR2 (Supplemental Fig. 2, Table I). These findings suggest that responsiveness to TLR2 and TLR4 agonists may be reactivated or amplified after TLR5 stimulation, allowing the production of a second wave of effectors.

The relevance of TLR5 signaling in defense has recently been assessed. Flagellin-mediated protection of rodents and nonhuman primates against lethal irradiation was associated with CSF3-mediated granulopoiesis and the antiapoptotic effect of superoxide dismutase 2 (47). Flagellin treatment has been linked to resistance against inflammatory colitis and gut infections (40, 48). The TLR5-induced circulating and local production of IL-17/IL-22 may be the main driving force behind these protective effects. The contribution of IL-22 was recently suggested as instrumental in the control of infection with enterococci (40). In response to IL-

17R and IL-22R signaling, epithelial and stromal cells produce antimicrobial peptides (RegIII), CXCL chemokines, and growth factors (CSF3) for neutrophils, all of which are involved in mucosal protection (3–7, 38). Flagellin treatment prompted the expression of similar factors. In addition, our study identified other potential effectors of the TLR/IL-17R/IL-22R axis, such as antiviral molecules (ISG15, ISG20, OAS2, and OAS3), acute-phase proteins (SAA2, SAA3, and PTX3), and superoxide-mediated killing (NCF1, NOX1, and superoxide dismutase 2).

The Lin^{neg}CD127⁺CD4⁺ cells described in this paper resemble the LTi cells that are instrumental in the development of secondary/tertiary lymphoid tissues (such as Peyer's patches or isolated lymphoid follicles) (13, 49). Intestinal LTi cells express lymphotoxin β and CCR6 and CXCR5, the receptors for CCL20 and CXCL13, respectively (13, 49). CXCL13 and CCL20 are produced by epithelial/stromal cells and are involved in the clustering of lymphocytes, DCs, and LTi to form lymphoid follicles (50, 51). Ectopic epithelial expression of CXCL13 increases the number of LTi cells (which produce IL-22 constitutively) and isolated

lymphoid follicles (13). Our work revealed that flagellin upregulated gut expression of genes coding for lymphotoxin β , CXCL13, and CCL20. We previously showed that flagellin triggers CCL20 production in intestinal epithelial cells (31). Hence, TLR5 signaling in both epithelial and hematopoietic cells may increase the development of secondary/tertiary lymphoid tissues. Recent studies showed that TLR2, TLR4, and Nod1 are involved in the development of lymphoid follicles (50, 51). Pattern recognition receptors in general and TLRs in particular may have a pivotal role in simultaneously conditioning the antimicrobial environment and new ecotopic sites for the development of mucosal adaptive immunity.

In conclusion, the current study found that Lin^{neg}CD127⁺ cells constitute a rapidly reacting, innate source of IL-17A, IL-17F, and IL-22 in response to TLR signaling. We hypothesize that this immune reaction occurs during microbial penetration into the lamina propria and stimulates innate effectors to locally clear the infection. Similar cell populations have been identified in humans (14, 16), and so, it remains to be seen whether TLR stimulation can promote activation of these innate immune cells.

Acknowledgments

We thank Michel Simonet and François Trottein for critical reading of the manuscript, Shizuo Akira for *Tlr5*^{-/-} mice, David Dombrowicz for *Rag2*^{-/-}*Il2rg*^{-/-} mice, and Christelle Favéu and Laxmi Koodun for technical assistance.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Beutler, B., Z. Jiang, P. Georgel, K. Crozat, B. Croker, S. Rutschmann, X. Du, and K. Hoebe. 2006. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu. Rev. Immunol.* 24: 353–389.
- Sansonetti, P. J. 2004. War and peace at mucosal surfaces. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 953–964.
- Aujla, S. J., Y. R. Chan, M. Zheng, M. Fei, D. J. Askew, D. A. Pociask, T. A. Reinhart, F. McAllister, J. Edeal, K. Gaus, et al. 2008. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat. Med.* 14: 275–281.
- Zheng, Y., P. A. Valdez, D. M. Danilenko, Y. Hu, S. M. Sa, Q. Gong, A. R. Abbas, Z. Modrusan, N. Ghilardi, F. J. de Sauvage, and W. Ouyang. 2008. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat. Med.* 14: 282–289.
- Conti, H. R., F. Shen, N. Nayyar, E. Stocum, J. N. Sun, M. J. Lindemann, A. W. Ho, J. H. Hai, J. J. Yu, J. W. Jung, et al. 2009. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J. Exp. Med.* 206: 299–311.
- Ishigame, H., S. Kakuta, T. Nagai, M. Kadoki, A. Nambu, Y. Komiya, N. Fujikado, Y. Tanahashi, A. Akitsu, H. Kotaki, et al. 2009. Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucocutaneous bacterial infection and allergic responses. *Immunity* 30: 108–119.
- Gaffen, S. L. 2009. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat. Rev. Immunol.* 9: 556–567.
- Kolls, J. K., P. B. McCray, Jr., and Y. R. Chan. 2008. Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 829–835.
- Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka, and V. K. Kuchroo. 2009. IL-17 and Th17 cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27: 485–517.
- Shibata, K., H. Yamada, H. Hara, K. Kishihara, and Y. Yoshikai. 2007. Resident V δ 1⁺ $\gamma\delta$ T cells control early infiltration of neutrophils after *Escherichia coli* infection via IL-17 production. *J. Immunol.* 178: 4466–4472.
- Michel, M. L., A. C. Keller, C. Paget, M. Fujio, F. Trottein, P. B. Savage, C. H. Wong, E. Schneider, M. Dy, and M. C. Leite-de-Moraes. 2007. Identification of an IL-17-producing NK1.1^{neg} iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J. Exp. Med.* 204: 995–1001.
- Takatori, H., Y. Kanno, W. T. Watford, C. M. Tato, G. Weiss, I. I. Ivanov, II, D. R. Littman, and J. J. O'Shea. 2009. Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22. *J. Exp. Med.* 206: 35–41.
- Marchesi, F., A. P. Martin, N. Thirunavaran, E. Devany, L. Mayer, M. G. Grisotto, G. C. Furtado, and S. A. Lira. 2009. CXCL13 expression in the gut promotes accumulation of IL-22-producing lymphoid tissue-inducer cells, and formation of isolated lymphoid follicles. *Mucosal Immunol.* 2: 486–494.
- Cella, M., A. Fuchs, W. Vermi, F. Facchetti, K. Otero, J. K. Lennerz, J. M. Doherty, J. C. Mills, and M. Colonna. 2009. A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature* 457: 722–725.
- Sanos, S. L., V. L. Bui, A. Mortha, K. Oberle, C. Heners, C. Johner, and A. Diefenbach. 2009. ROR γ t and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46⁺ cells. *Nat. Immunol.* 10: 83–91.
- Cupedo, T., N. K. Crellin, N. Papazian, E. J. Rombouts, K. Weijer, J. L. Grogan, W. E. Fibbe, J. J. Cornelissen, and H. Spits. 2009. Human fetal lymphoid tissue-inducer cells are interleukin 17-producing precursors to RORC⁺CD127⁺ natural killer-like cells. *Nat. Immunol.* 10: 66–74.
- Satoh-Takayama, N., C. A. Vossenhennrich, S. Lesjean-Pottier, S. Sawa, M. Lochner, F. Rattis, J. J. Mention, K. Thiam, N. Cerf-Bennussan, O. Mandelboim, et al. 2008. Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46⁺ cells that provide innate mucosal immune defense. *Immunity* 29: 958–970.
- Luci, C., A. Reyniers, I. I. Ivanov, C. Cognet, L. Chiche, L. Chasson, J. Hardwigen, E. Anguiano, J. Banchereau, D. Chaussabel, et al. 2009. Influence of the transcription factor ROR γ t on the development of NKp46⁺ cell populations in gut and skin. *Nat. Immunol.* 10: 75–82.
- Ramos, H. C., M. Rumbo, and J. C. Sirard. 2004. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol.* 12: 509–517.
- Bambou, J. C., A. Giraud, S. Menard, B. Begue, S. Rakotobe, M. Heyman, F. Taddei, N. Cerf-Bennussan, and V. Gaboriau-Routhiau. 2004. In vitro and ex vivo activation of the TLR5 signaling pathway in intestinal epithelial cells by a commensal *Escherichia coli* strain. *J. Biol. Chem.* 279: 42984–42992.
- Didierlaurent, A., J. Goulding, S. Patel, R. Snelgrove, L. Low, M. Bebie, T. Lawrence, L. S. van Rij, B. N. Lambrecht, J. C. Sirard, and T. Hussell. 2008. Sustained desensitization to bacterial Toll-like receptor ligands after resolution of respiratory influenza infection. *J. Exp. Med.* 205: 323–329.
- Hughes, E. A., and J. E. Galán. 2002. Immune response to *Salmonella*: location, location, location? *Immunity* 16: 325–328.
- Uematsu, S., K. Fujimoto, M. H. Jang, B. G. Yang, Y. J. Jung, M. Nishiyama, S. Sato, T. Tsujimura, M. Yamamoto, Y. Yokota, et al. 2008. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat. Immunol.* 9: 769–776.
- Uematsu, S., M. H. Jang, N. Chevrier, Z. Guo, Y. Kumagai, M. Yamamoto, H. Kato, N. Sougawa, H. Matsui, H. Kuwata, et al. 2006. Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c⁺ lamina propria cells. *Nat. Immunol.* 7: 868–874.
- Didierlaurent, A., I. Ferrero, L. A. Otten, B. Dubois, M. Reinhardt, H. Carlsen, R. Blomhoff, S. Akira, J. P. Kraehenbuhl, and J. C. Sirard. 2004. Flagellin promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2-type response. *J. Immunol.* 172: 6922–6930.
- Hapfelmeier, S., A. J. Müller, B. Stecher, P. Kaiser, M. Barthel, K. Endt, M. Eberhard, R. Robbiani, C. A. Jacobi, M. Heikenwalder, et al. 2008. Microbe sampling by mucosal dendritic cells is a discrete, MyD88-independent step in *Delta*inV *S. Typhimurium* colitis. *J. Exp. Med.* 205: 437–450.
- Eilebrecht, S., F. X. Pellay, P. Odenwälder, G. Brysbaert, B. J. Benecke, and A. Benecke. 2008. EBER2 RNA-induced transcriptome changes identify cellular processes likely targeted during Epstein Barr Virus infection. *BMC Res Notes* 1: 100.
- Noth, S., G. Brysbaert, and A. Benecke. 2006. Normalization using weighted negative second order exponential error functions (NeONORM) provides robustness against asymmetries in comparative transcriptome profiles and avoids false calls. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 4: 90–109.
- Dumoutier, L., E. Van Roost, D. Colau, and J. C. Renaud. 2000. Human interleukin-10-related T cell-derived inducible factor: molecular cloning and functional characterization as an hepatocyte-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 10144–10149.
- Hirota, K., H. Yoshitomi, M. Hashimoto, S. Maeda, S. Teradaira, N. Sugimoto, T. Yamaguchi, T. Nomura, H. Ito, T. Nakamura, et al. 2007. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J. Exp. Med.* 204: 2803–2812.
- Sierro, F., B. Dubois, A. Coste, D. Kaiserlian, J. P. Kraehenbuhl, and J. C. Sirard. 2001. Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 13722–13727.
- Caron, G., D. Duluc, I. Frémaux, P. Jeannin, C. David, H. Gascan, and Y. Delneste. 2005. Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN- γ production by memory CD4⁺ T cells. *J. Immunol.* 175: 1551–1557.
- Chalifour, A., P. Jeannin, J. F. Gauchat, A. Blaecke, M. Malissard, T. N'Guyen, N. Thieblemont, and Y. Delneste. 2004. Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers α -defensin production. *Blood* 104: 1778–1783.
- Sanders, C. J., D. A. Moore, III, I. R. Williams, and A. T. Gewirtz. 2008. Both radioresistant and hemopoietic cells promote innate and adaptive immune responses to flagellin. *J. Immunol.* 180: 7184–7192.
- Janot, L., J. C. Sirard, T. Secher, N. Noulon, L. Fick, S. Akira, S. Uematsu, A. Didierlaurent, T. Hussell, B. Ryffel, and F. Erard. 2009. Radioresistant cells expressing TLR5 control the respiratory epithelium's innate immune responses to flagellin. *Eur. J. Immunol.* 39: 1587–1596.
- Caminschi, I., F. Ahmet, K. Heger, J. Brady, S. L. Nutt, D. Vremec, S. Pietersz, M. H. Lahoud, L. Schofield, D. S. Hansen, et al. 2007. Putative IKDCs are functionally and developmentally similar to natural killer cells, but not to dendritic cells. *J. Exp. Med.* 204: 2579–2590.
- Schmutz, S., N. Bosco, S. Chappaz, O. Boyman, H. Acha-Orbea, R. Ceredig, A. G. Rolink, and D. Finke. 2009. Cutting edge: IL-7 regulates the peripheral pool of adult ROR γ ⁺ lymphoid tissue inducer cells. *J. Immunol.* 183: 2217–2221.

38. Pickert, G., C. Neufert, M. Leppkes, Y. Zheng, N. Wittkopf, M. Warntjen, H. A. Lehr, S. Hirth, B. Weigmann, S. Wirtz, et al. 2009. STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J. Exp. Med.* 206: 1465–1472.
39. Zenewicz, L. A., G. D. Yancopoulos, D. M. Valenzuela, A. J. Murphy, S. Stevens, and R. A. Flavell. 2008. Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity* 29: 947–957.
40. Kinnebrew, M. A., C. Ubeda, L. A. Zenewicz, N. Smith, R. A. Flavell, and E. G. Pamer. 2010. Bacterial flagellin stimulates Toll-like receptor 5-dependent defense against vancomycin-resistant *Enterococcus* infection. *J. Infect. Dis.* 201: 534–543.
41. Veldhoen, M., K. Hirota, J. Christensen, A. O'Garra, and B. Stockinger. 2009. Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells. *J. Exp. Med.* 206: 43–49.
42. Schraml, B. U., K. Hildner, W. Ise, W. L. Lee, W. A. Smith, B. Solomon, G. Sahota, J. Sim, R. Mukasa, S. Cemerski, et al. 2009. The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation. *Nature* 460: 405–409.
43. Gascoyne, D. M., E. Long, H. Veiga-Fernandes, J. de Boer, O. Williams, B. Seddon, M. Coles, D. Kioussis, and H. J. Brady. 2009. The basic leucine zipper transcription factor E4BP4 is essential for natural killer cell development. *Nat. Immunol.* 10: 1118–1124.
44. Satoh-Takayama, N., S. Lesjean-Pottier, P. Vieira, S. Sawa, G. Eberl, C. A. Vosshenrich, and J. P. Di Santo. 2010. IL-7 and IL-15 independently program the differentiation of intestinal CD3⁺NKp46⁺ cell subsets from Id2-dependent precursors. *J. Exp. Med.* 207: 273–280.
45. Awasthi, A., L. Riolf-Blanco, A. Jäger, T. Korn, C. Pot, G. Galileos, E. Bettelli, V. K. Kuchroo, and M. Oukka. 2009. Cutting edge: IL-23 receptor gfp reporter mice reveal distinct populations of IL-17-producing cells. *J. Immunol.* 182: 5904–5908.
46. Cerovic, V., C. D. Jenkins, A. G. Barnes, S. W. Milling, G. G. MacPherson, and L. S. Klavinskis. 2009. Hyporesponsiveness of intestinal dendritic cells to TLR stimulation is limited to TLR4. *J. Immunol.* 182: 2405–2415.
47. Burdelya, L. G., V. I. Krivokrysenko, T. C. Tallant, E. Strom, A. S. Gleiberman, D. Gupta, O. V. Kurnasov, F. L. Fort, A. L. Osterman, J. A. Didonato, et al. 2008. An agonist of Toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models. *Science* 320: 226–230.
48. Vijay-Kumar, M., J. D. Aitken, C. J. Sanders, A. Frias, V. M. Sloane, J. Xu, A. S. Neish, M. Rojas, and A. T. Gewirtz. 2008. Flagellin treatment protects against chemicals, bacteria, viruses, and radiation. *J. Immunol.* 180: 8280–8285.
49. Meier, D., C. Bornmann, S. Chappaz, S. Schmutz, L. A. Otten, R. Ceredig, H. Acha-Orbea, and D. Finke. 2007. Ectopic lymphoid-organ development occurs through interleukin 7-mediated enhanced survival of lymphoid-tissue-inducer cells. *Immunity* 26: 643–654.
50. Bouskra, D., C. Brézillon, M. Bérard, C. Werts, R. Varona, I. G. Boneca, and G. Eberl. 2008. Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature* 456: 507–510.
51. Tsuji, M., K. Suzuki, H. Kitamura, M. Maruya, K. Kinoshita, I. I. Ivanov, K. Itoh, D. R. Littman, and S. Fagarasan. 2008. Requirement for lymphoid tissue-inducer cells in isolated follicle formation and T cell-independent immunoglobulin A generation in the gut. *Immunity* 29: 261–271.

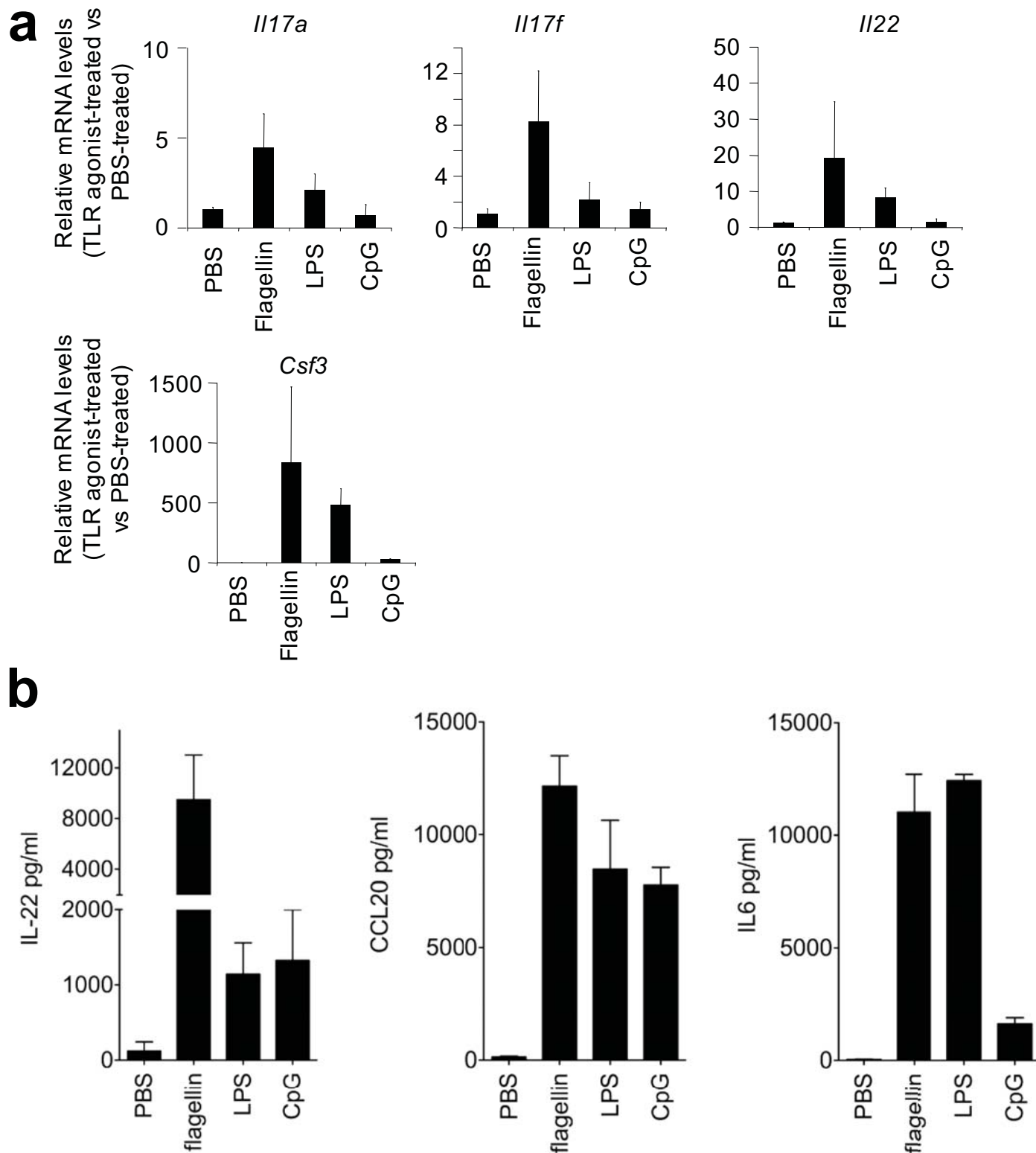


Figure S1: TLR signaling promotes Th17-related innate responses in liver and serum. C57BL/6 mice (n=3-4 per group) were treated i.p. with PBS only, flagellin (5 μ g), LPS (1 μ g) or CpG (5 μ g) in PBS. Livers and serum were sampled at 2h for relative quantification of mRNA levels and ELISA analysis respectively. (a) Relative gene expression. mRNA levels are expressed relative to the PBS-only group. (b) Cytokine levels in serum.

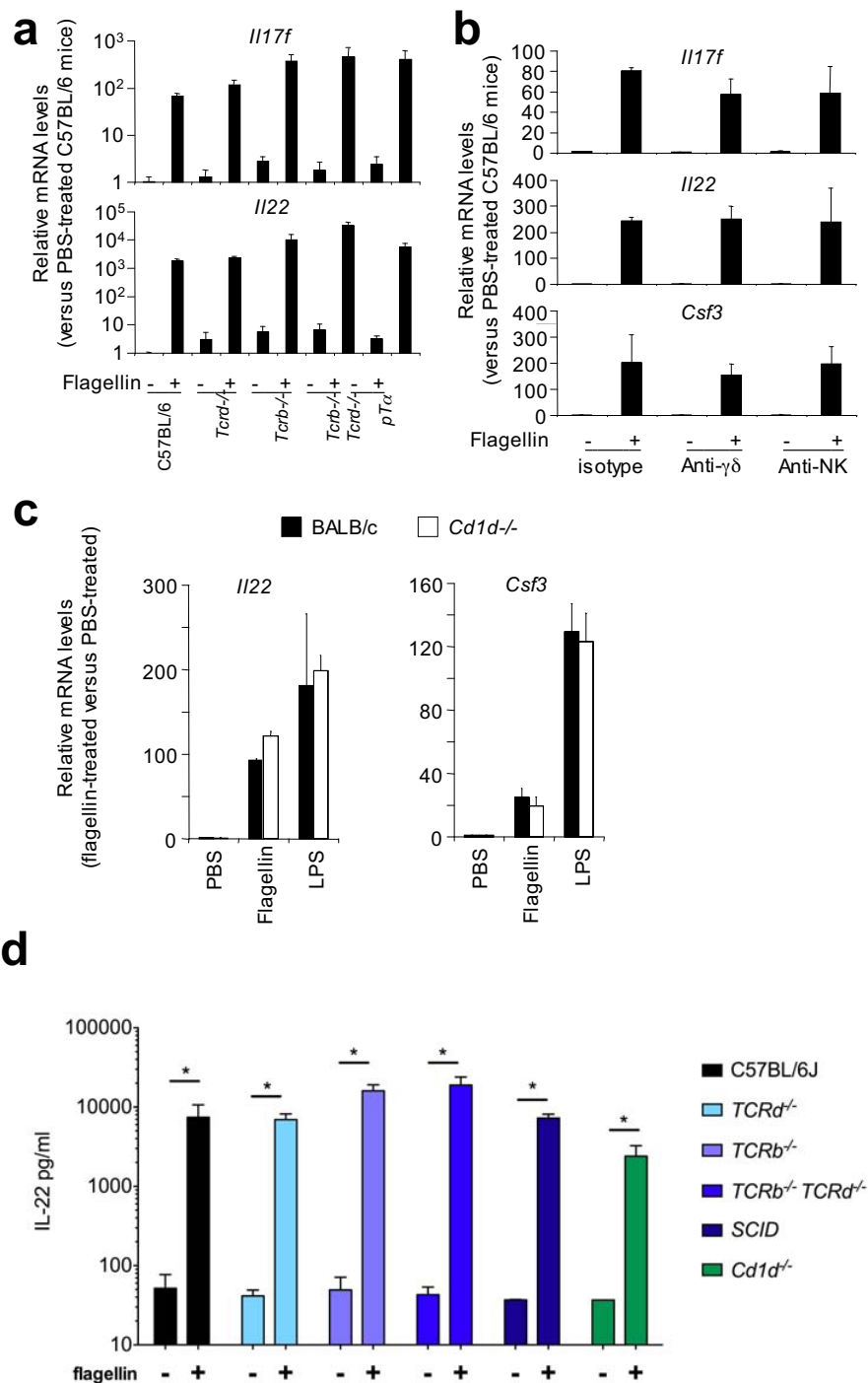
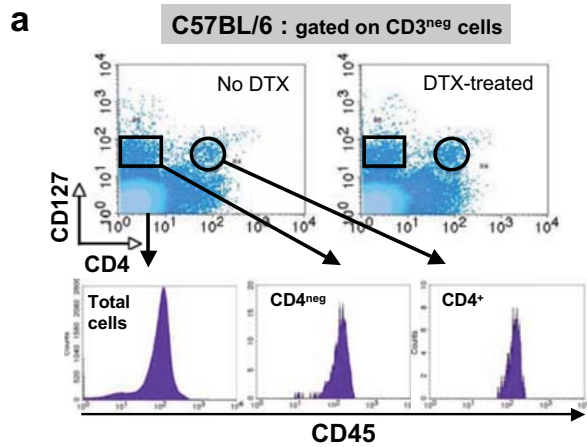
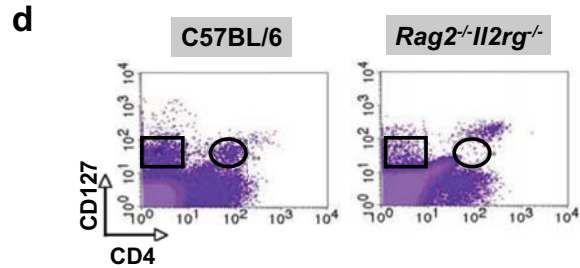
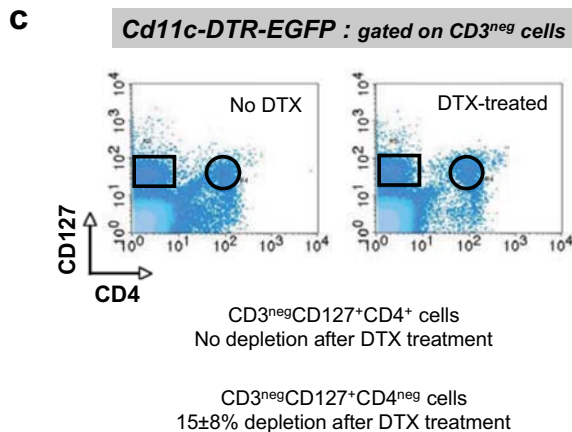
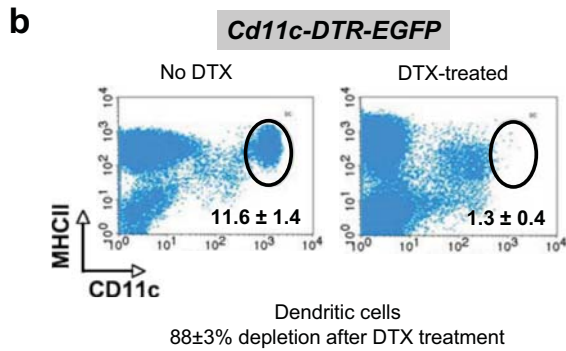


Figure S2: NK, NKT cells and TCR $\alpha\beta$ - and TCR $\gamma\delta$ -expressing lymphocytes are not required for IL-17 and IL-22 cytokine production following TLR5 stimulation. Mice (n=3-4 per group) were treated i.p. with PBS only or flagellin (5 μ g) in PBS. Tissues were assayed 2h after injection for the relative quantification of mRNA levels and ELISA. (a, c) Spleen response in C57BL/6, *Tcrb*^{-/-}, *Tcrd*^{-/-}, *Tcrb*^{-/-}*Tcrd*^{-/-}, and transgenic *pre-TCR α* animals that have increased number of $\gamma\delta$ lymphocytes (a) and in BALB/c and *Cd1d*^{-/-} mice (c). (b) Response in mesenteric lymph nodes of mice depleted for $\gamma\delta$ T or NK cells by mAb treatment. mRNA levels are expressed relative to the PBS-only group. (d) Cytokine levels in serum. Significant differences between PBS- and flagellin-treated animals are indicated.



CD3^{neg}CD127⁺CD4⁺ cells: no depletion after DTX
 CD3^{neg}CD127⁺CD4^{neg} cells: 1 ± 3% depletion after DTX



Cell number per spleen	C57BL/6	Rag2 ^{-/-} Il2rg ^{-/-}
CD3 ^{neg} CD127 ⁺ CD4 ⁺ cells	~ 50 000	~2 500
CD3 ^{neg} CD127 ⁺ CD4 ^{neg} cells	~125 000	~15 000

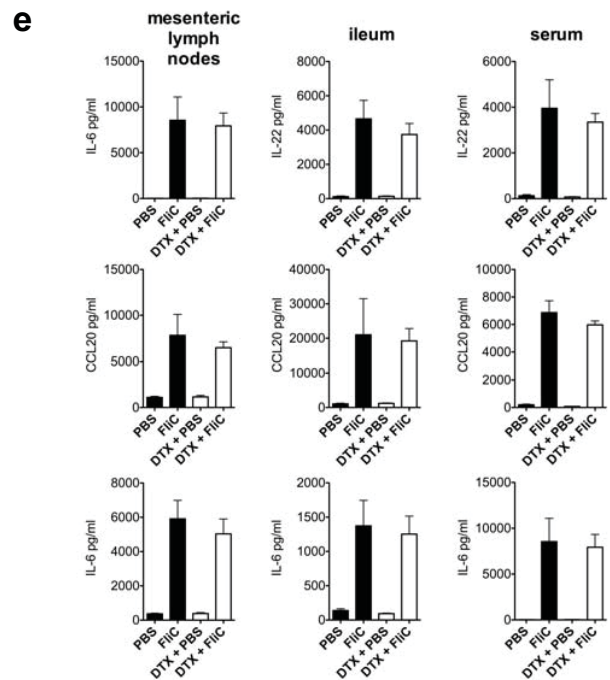


Figure S3: Diphtheria toxin (DTX) treatment does not alter CD3^{neg}CD127⁺ splenic cells and flagellin-mediated innate response. Spleens and tissues from C57BL/6 (a, d and e), *Cd11c-DTR-EGFP* (b and c) and *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* mice (d) mice (n=3-4) were sampled after the indicated treatment. (a, b, c and e). Mice were treated i.p. with DTX (100 ng) or PBS. In a-c, spleen cells were isolated at 24h and analyzed by flow cytometry. In e, mice were treated 24h after DTX with flagellin or PBS. Two hours later, serum was sampled and a segment of distal ileum (5cm) and the mesenteric lymph nodes (MLN) were lysed in 1mL to extract proteins before proceeding to cytokine analysis by ELISA. (d) Spleen cells from C57BL/6 and *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* mice were analyzed by flow cytometry.

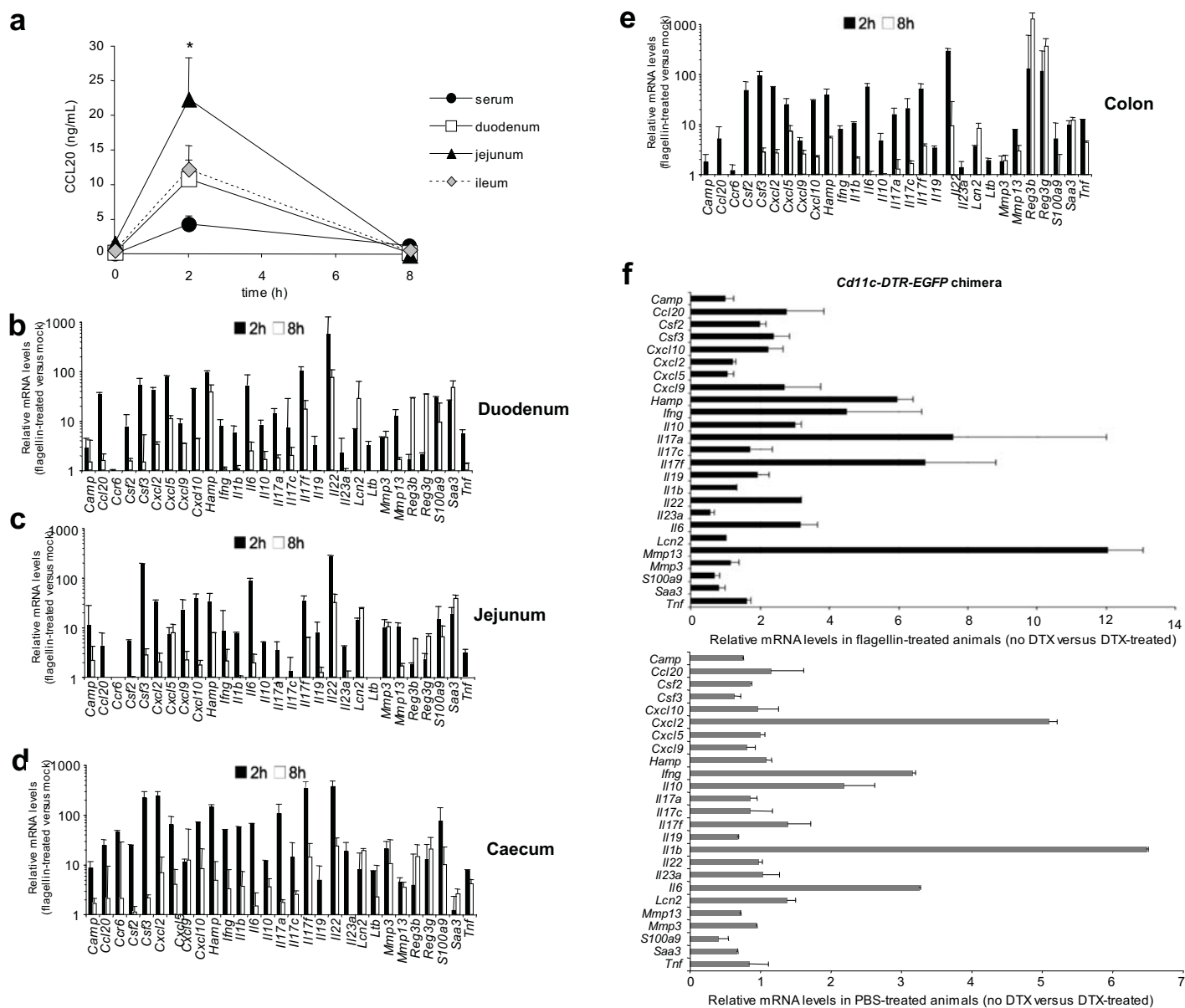


Figure S4: TLR5-mediated Th17-related responses throughout the intestine segments. Mice (n=3-4 per group) were treated i.p. with PBS only or flagellin (5 μ g) in PBS and intestinal tissue segments (5 cm for proximal duodenum, jejunum, distal ileum, 3 cm for proximal colon and the whole caecum) were sampled at the indicated time points for relative quantification of (i) cytokines in an ELISA and (ii) mRNA levels using qRT-PCR. (a) CCL20 production in the various segments of the intestinal tract of C57BL/6 animals. Tissue segments were homogenized within 1 mL of lysis buffer. The results shown come from one of 2 representative experiments. (b-e) Time course analysis of the transcriptional response in C57BL/6 gut segments: duodenum (b), jejunum (c), caecum (d), and proximal colon (e). mRNA levels are expressed as relative levels compared to PBS-only group. (f) Contribution of DC in Th17-related innate response in ileum. mRNA levels in *Cd11c-DTR-EGFP*→C57BL/6 mice at 2h after flagellin or PBS treatment are expressed as relative levels in no-DTX compared to DTX-treated animals. *, $P < 0.05$.

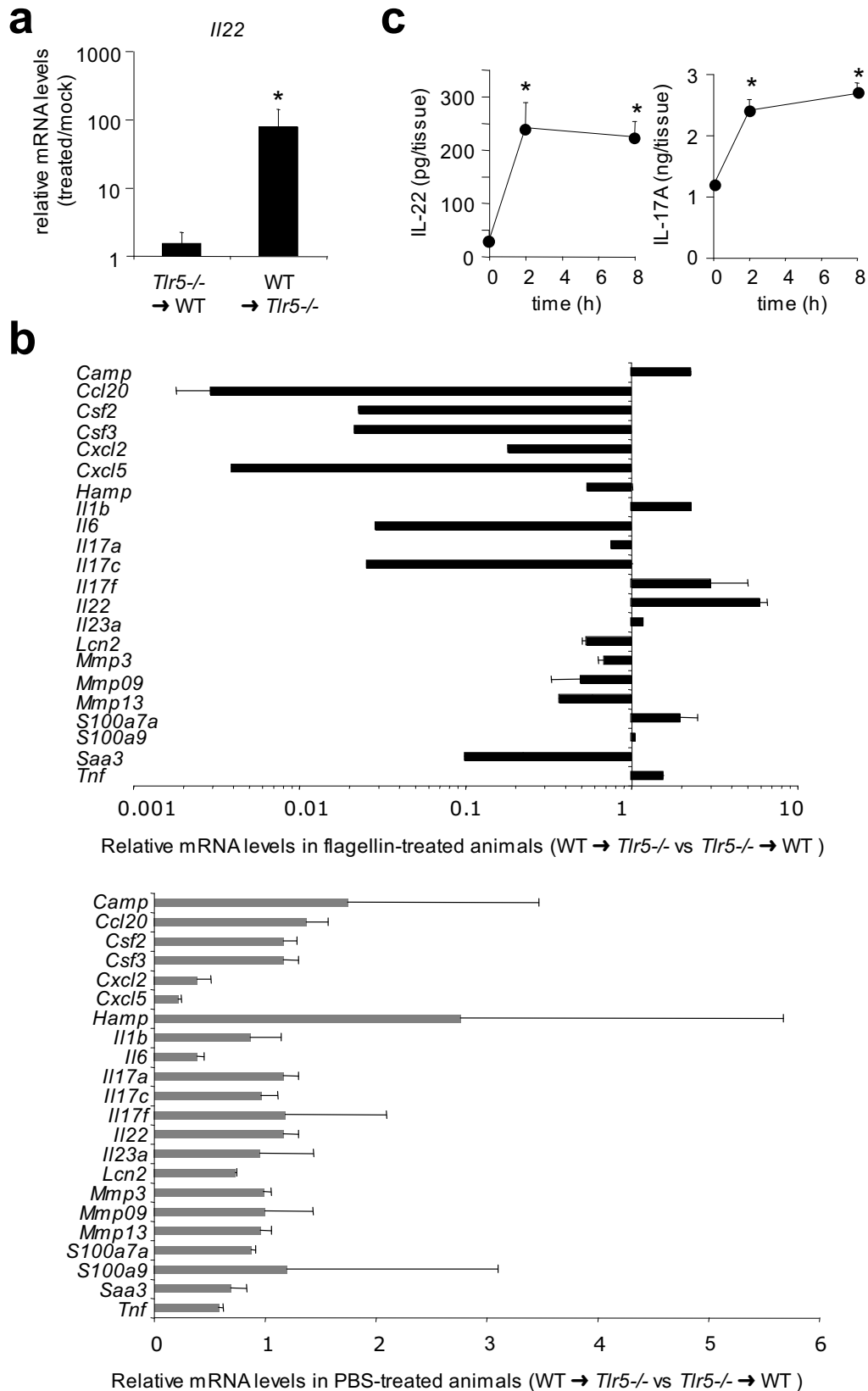


Figure S5: TLR5-mediated response in lung. C57BL/6 mice (n=3-4 per group) were treated i.p. with PBS alone or flagellin (5 μ g) in PBS and pulmonary tissues were sampled at 2h (a, b) or at indicated times (c). (a, b) Transcriptional response induced by TLR5 signaling in hematopoietic and stromal compartments. mRNA levels at 2h after flagellin treatment are quantified by qRT-PCR and expressed as relative levels in WT→*Tlr5*^{-/-} compared to *Tlr5*^{-/-}→WT bone marrow chimera. (c) Cytokine detection by ELISA in the lung of C57BL/6 (WT) animals. *, $P < 0.05$.

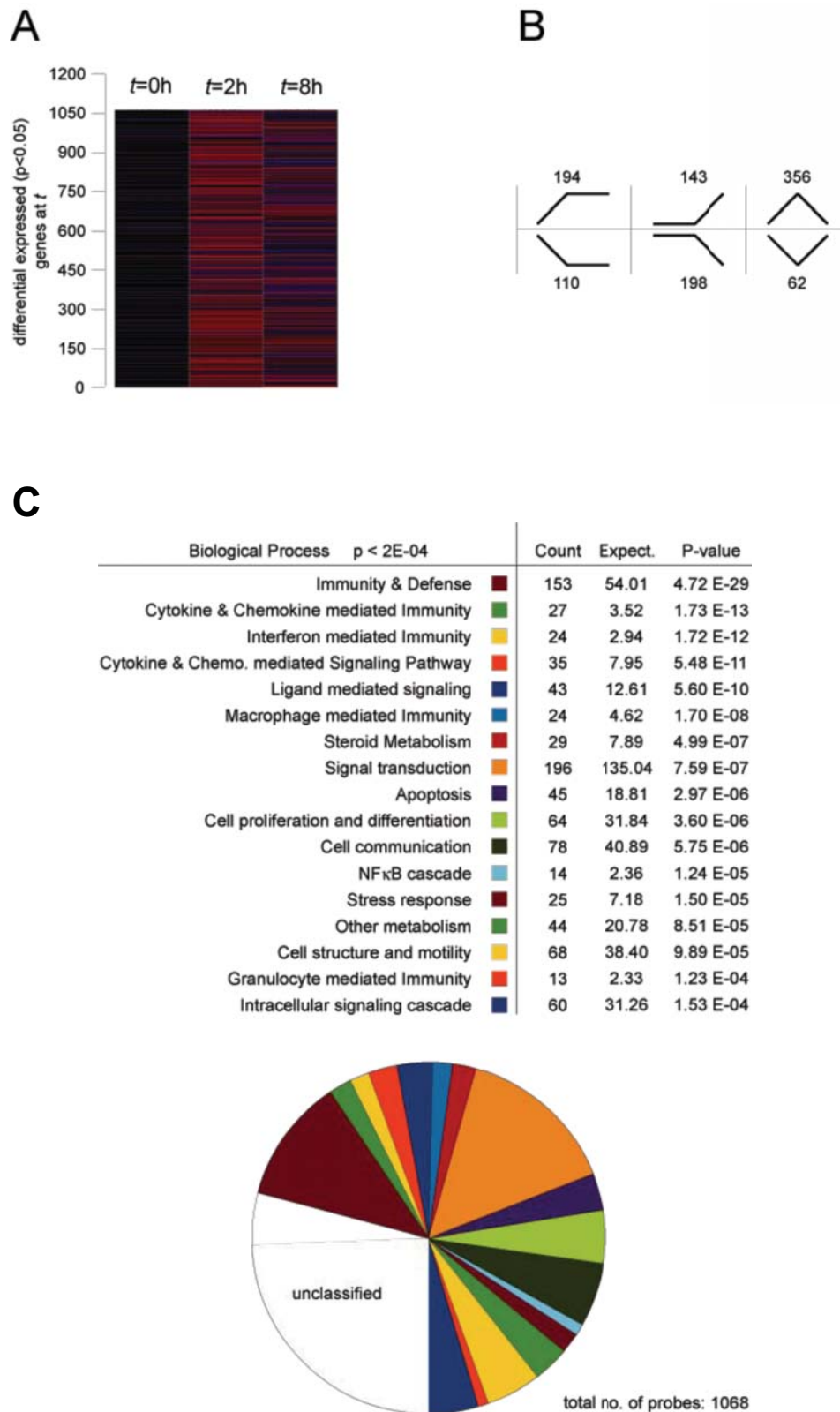


Figure S6: Transcriptome analysis of differential gene expression in flagellin-treated gut. Microarray data of distal ileal segments from control mice or mice treated i.p. with flagellin (5μg) for 2h and 8h. (a) Heatmaps are shown to illustrate the total number and the relative expression change of regulated genes ($p < 0.05$). (b, c) Time series analysis of samples. (b) Patterns of regulation as represented by the six different schematic drawings. The total number of genes statistically significantly matching to each pattern is indicated. (c) Ontological meta-analysis according to biological processes ($p < 2E-4$).

Résultats complémentaires de l'article 3

Nos résultats montrent que l'administration systémique de flagelline induit la production systémique et muqueuse des cytokines IL-17A/F et IL-22, cytokines importantes pour la défense des muqueuses contre les infections par des cellules lymphoïdes innées (CLI). Des études complémentaires préliminaires ont donc été réalisées afin de déterminer la contribution des CLI dans la défense anti-infectieuse.

La flagelline protège les souris d'une infection orale à *Yersinia pseudotuberculosis*

Un modèle murin d'infection orale avec la bactérie entéropathogène *Yersinia pseudotuberculosis* a été utilisé (Carnoy *et al.*, 2000). Les souris ont été traitées par voie intrapéritonéale avec de la flagelline, 30 minutes avant de procéder à l'infection orale avec une épreuve létale de bactéries. Par la suite, la survie des souris a été observée et la charge bactérienne dans la rate, le foie, les ganglions mésentériques et les plaques de Peyer ont été analysées 3 jours post-infection. Nous avons trouvé qu'un traitement à la flagelline protège les souris de l'infection létale (70% de survie) alors que les souris témoins meurt dans leur totalité (Figure 21A). La protection a été corrélée avec une charge bactérienne réduite (diminution d'environ 10 fois) dans les organes des animaux traités (Figure 21B). De manière intéressante, une administration de LPS n'a pas induit de production innée d'IL-17 et IL-22 dans les intestins (résultats non montrés) et nous n'avons pas observé de protection contre l'infection à *Yersinia*.

Ces données suggèrent que la flagelline stimule des défenses spécifiques lorsqu'elle est administrée par voie systémique. Néanmoins, la contribution des CLI CD3^{neg}CD127⁺ et des cytokines IL-17 et IL-22 dans les mécanismes de défense restent à démontrer.

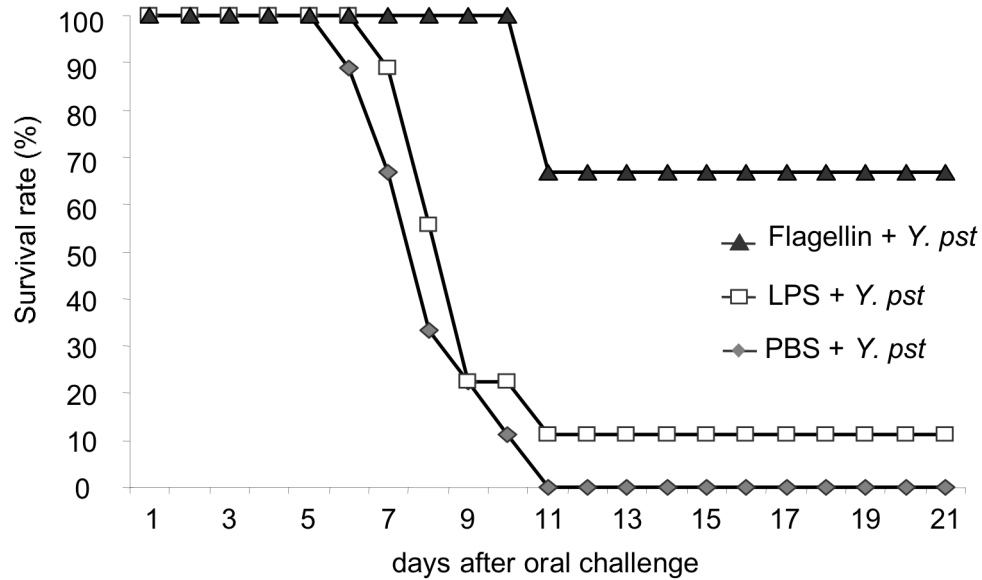
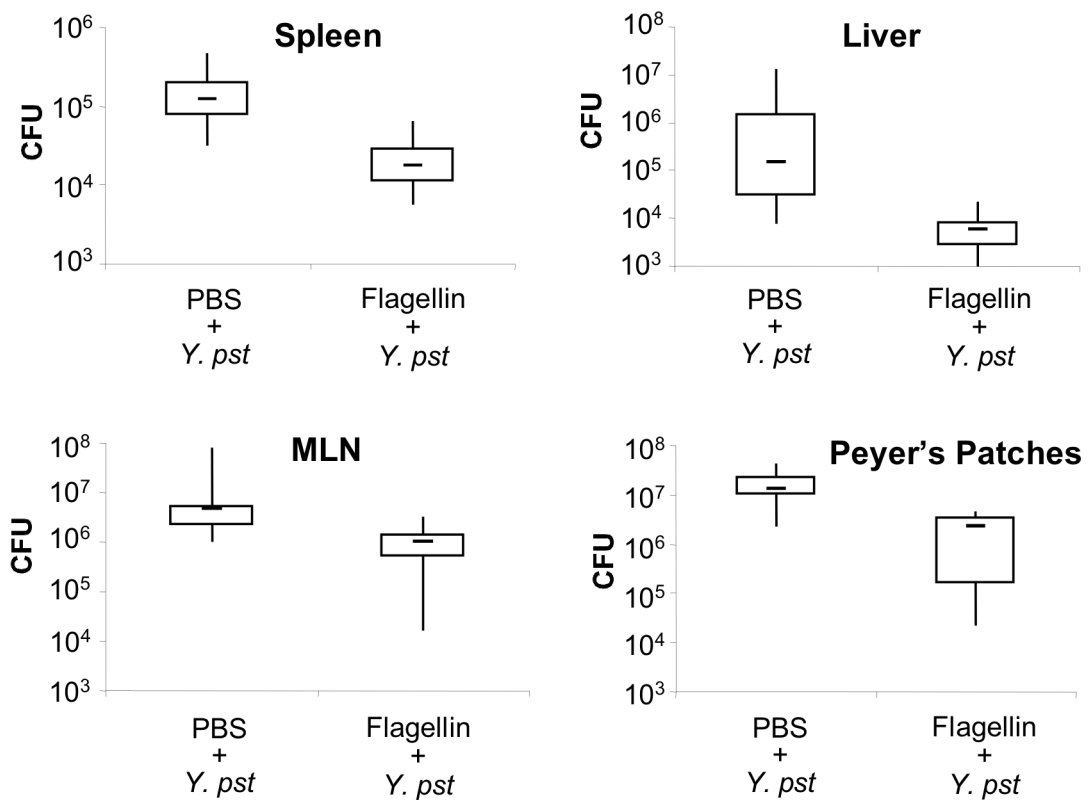
A**B**

Figure 21 : Un traitement flagelline protège les souris d'une infection à *Y. pseudotuberculosis*.

Des souris BALB/c (n=8-9) ont été traitées par voie intrapéritonéale avec du PBS, de la flagelline (1µg) ou du LPS (5µg) 30min avant une administration orale de $7,6 \cdot 10^8$ *Y. pseudotuberculosis* (*Y. pst*). (A) La survie. (B) La charge bactérienne dans la rate, le foie, les ganglions mesentériques (MLN) et les plaques de peyer après 3 jours d'infection. La moyenne des CFU (Colony-forming units) est représentée par les barres horizontales, les premier et troisième quartiles sont représentés par le bas et le haut des cadres, respectivement.

**DISCUSSION
ET
PERSPECTIVES**

Dans ce travail, nous avons caractérisé les effets immunologiques de la flagelline, agoniste de TLR5, dans les muqueuses (Figure 22). Ce motif microbien est spécifiquement exprimé au niveau des sites muqueux par de nombreuses bactéries pathogènes (Hughes et Galan, 2002; Ramos *et al.*, 2004). En revanche, son expression est réprimée lorsqu'une bactérie comme le colibacille établie une interaction mutualiste avec l'hôte (Giraud *et al.*, 2008). Nous avons émis l'hypothèse que, les muqueuses étant compartimentées, la détection de la flagelline était également compartimentée et les réponses immunitaires distinctes. Dans ce but, nous avons étudié l'immunité de l'hôte en réponse à la flagelline administrée par voie locale et systémique, situations mimant respectivement la colonisation et l'invasion microbienne.

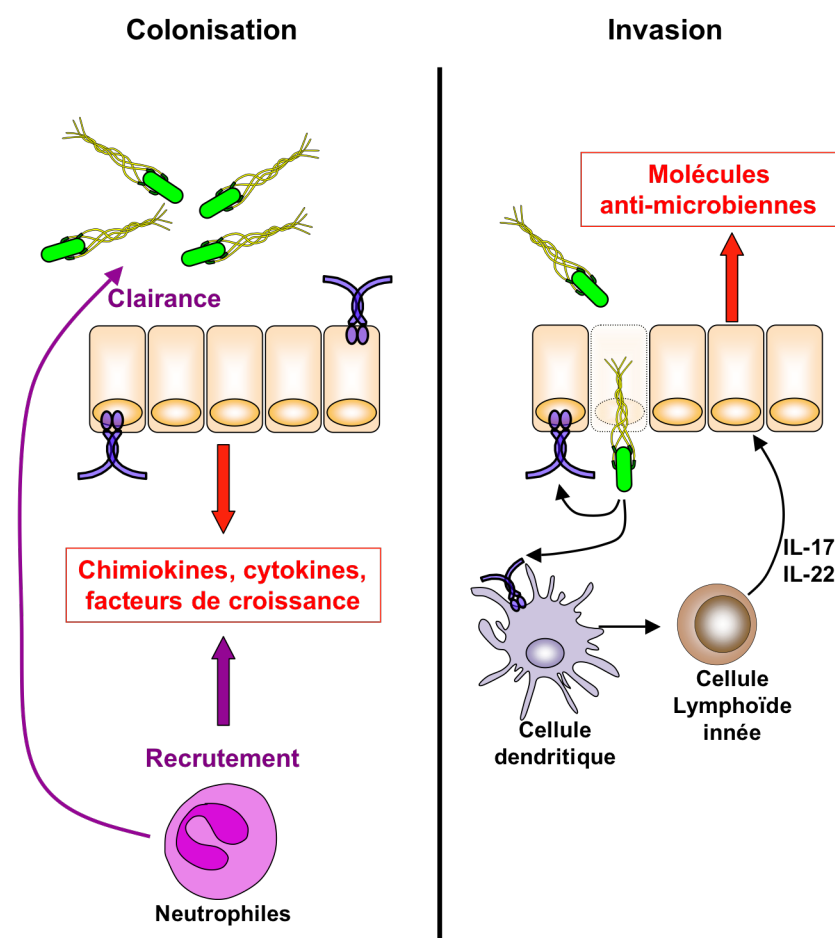


Figure 22 : Protection des muqueuses à la colonisation et à l'invasion microbienne.

Lors d'une colonisation de la muqueuse, les pathogènes activent les TLR présents à la surface apicale des cellules épithéliales. Ces dernières répondent à la stimulation en sécrétant des cytokines et chimiokines et de facteurs de croissance. Les chimiokines recrutent des neutrophiles (PMN), qui migrent dans la lumière pour éliminer les pathogènes. Les facteurs de croissance permettent de préserver l'intégrité des tissus muqueux et de promouvoir la survie des neutrophiles. Ainsi, la reconnaissance épithéliale de la colonisation microbienne induit le recrutement des neutrophiles qui contrôlerait l'infection. Lors d'une invasion, les pathogènes vont s'accrocher au parenchyme des muqueuses et activer de nouvelles cellules sentinelles. En particulier, l'activation des cellules dendritiques peut provoquer la stimulation des cellules lymphoïdes à produire les cytokines IL-17 et IL-22. Ces cytokines à leur tour vont cibler l'épithélium et déclencher une réponse épithéliale anti-infectieuse couplée à des mécanismes de réparation cellulaire.

La première partie de ce travail a mis en évidence pour la première fois que la signalisation TLR épithéliale est nécessaire et suffisante à un effet adjuvant sur la réponse adaptative. Ce concept d'adjuvant épithélial permettrait de disséquer le mécanisme d'action d'adjuvants connus sous un nouvel angle et de cribler de nouvelles molécules. Par une approche similaire, nous avons mis en évidence que l'administration muqueuse de flagelline pouvait avoir des intérêts thérapeutiques dans les infections muqueuses.

La seconde partie de cette thèse a consisté en l'exploration de l'immunité mise en œuvre dans le chorion des muqueuses intestinales et respiratoires. Nos travaux ont montré pour la première fois que la signalisation TLR5 active spécifiquement des cellules lymphoïdes innées (CLI) à produire les cytokines IL-17 et IL-22, lesquelles stimulent une réponse épithéliale avec une signature anti-infectieuse. La contribution de ces cellules à la défense innée et à la réponse adaptative des muqueuses reste cependant à étudier.

Signalisation TLR épithéliale : rôle essentiel dans l'immunité muqueuse

De nombreuses études ont rapporté que l'épithélium conditionne l'immunité innée et adaptative (pour des revues récentes voir (Abreu, 2010; Fritz *et al.*, 2008). En effet, la stimulation microbienne ou TLR entraîne une cascade de processus responsables de la défense innée. Les travaux pionniers des Dr Eckmann, Kagnoff et McCormick ont montré au début des années 1990 que les cellules épithéliales intestinales produisent divers médiateurs pro-inflammatoires dont des chimiokines spécifiques des neutrophiles, provoquant de ce fait un recrutement et un passage trans-épithélial de ces cellules dans la lumière (Eckmann *et al.*, 1993; McCormick *et al.*, 1993). De même, cette réponse stéréotypique est retrouvée dans les cellules épithéliales d'origine broncho-alvéolaires (Evans *et al.*, 2010). La contribution *in vivo* des cellules épithéliales dans la réponse innée aux agonistes TLR a été reconnue avec des modèles de souris chimères ou déficientes dans les cellules épithéliales pour des composants de la voie TLR (Feuillet *et al.*, 2006; Hammad *et al.*, 2009; Janot *et al.*, 2009; Nenci *et al.*, 2007; Noulon *et al.*, 2005; Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004; Raoust *et al.*, 2009; Vaishnava *et al.*, 2008). Dans le cadre de TLR5, des travaux précédents ainsi que ceux de l'article 2 présenté ici supportent le rôle majeur et quasi-exclusif de l'épithélium dans l'immunité innée anti-infectieuse des muqueuses (Didierlaurent *et al.*, 2008; Feuillet *et al.*, 2006; Janot *et al.*, 2009).

La contribution de la signalisation TLR épithéliale ou stromale dans la réponse adaptative a également été mise en évidence par la production de médiateurs modulant l'activité des CPA, des lymphocytes T et des lymphocytes B. Ainsi, la cytokine TSLP ("thymic stromal lymphopoietin") qui module l'activité des DC et de certains lymphocytes ou les facteurs BAFF ("B cell activating factor") et APRIL ("a proliferation-inducing ligand") qui régulent la réponse en anticorps, sont tous deux induits par la signalisation épithéliale dépendante de TLR (Abreu, 2010; He *et al.*, 2007; Lee et Ziegler, 2007). De façon similaire, CCL20 a été proposé comme chimiokine épithéliale régulant le recrutement de CPA dans

des contextes inflammatoires ; son expression peut être contrôlée par les agonistes de TLR2 et TLR5 (Article2) (Le Borgne *et al.*, 2006; Pichavant *et al.*, 2006). *In vivo*, il a été démontré que les cellules structurales peuvent contribuer avec les cellules hématopoïétiques à la réponse adaptative en particulier lors d'une stimulation dépendante de TLR9 (Sato et Iwasaki, 2004).

Notre étude de l'article 2 a montré que les cellules épithéliales bronchiques ou alvéolaires présentent une signature transcriptionnelle, en réponse à la signalisation TLR5, similaire à celle décrite pour le poumon dans un modèle d'immunisation intranasale. De plus, cette signature dépend des cellules radiorésistantes du poumon qui sont indispensables à l'effet adjuvant de la flagelline. Ces observations indiquent donc que les cellules épithéliales peuvent exclusivement conditionner, et non seulement influencer, la mise en place de la réponse adaptative. Des conclusions similaires ont été réalisées par le groupe du Dr.-Lambrecht. Ses travaux ont montré l'importance des cellules structurales dans l'établissement d'une réponse Th2 dépendante de TLR4 (Hammad *et al.*, 2009). Des souris chimères dont seules les cellules structurales sont compétentes pour la signalisation TLR4, immunisées par voie intra-trachéale avec une formulation de LPS + ovalbumine ont la même capacité à développer une réponse adaptative que des souris conventionnelles. En revanche, les animaux dont seules les cellules hématopoïétiques sont compétentes pour la signalisation TLR4 ne répondent plus à l'antigène. D'autres études ont montré que les cellules épithéliales intestinales présentent une signature transcriptionnelle à la flagelline similaire à celle observée dans ce travail sur le poumon (Sierro *et al.*, 2001; Zeng *et al.*, 2003). Ces données suggèrent donc que des processus similaires opèrent au sein de la muqueuse intestinale. En conclusion, nous proposons que la signalisation épithéliale via TLR5 conditionnerait le recrutement et l'activation de CPA, de même que la pénétration de l'antigène à travers l'épithélium afin de promouvoir la réponse adaptative suite à une administration muqueuse.

Programmer le retour à l'homéostasie

La flagelline introduite par voie intranasale induit une réponse rapide et de grande amplitude. Cette réponse présente cependant la caractéristique d'être transitoire. Les mécanismes responsables du retour à l'homéostasie sont multiples et sous le contrôle de la signalisation épithéliale. L'analyse par puce à ADN a montré une augmentation précoce de l'expression des gènes codant les régulateurs négatifs A20, ZFP36, I κ B α et ATF3 (Figure 5 + tableau supplémentaire 1 du papier 2). Ces régulateurs agissent tout au long de la cascade de signalisation, multipliant ainsi les points de contrôle qui bloquent les réponses pro-inflammatoires intempestives, prolongées et potentiellement délétères aux fonctions physiologiques des muqueuses. La déubiquitine A20 participe à l'arrêt de la signalisation TLR, en particulier dans les cellules épithéliales (Boone *et al.*, 2004; Oshima *et al.*, 2010). L'expression épithéliale d'A20 est essentielle pour contenir une inflammation intestinale et

permettre le retour à l'homéostasie. L'expression épithéliale d'A20 est essentielle pour contenir une inflammation intestinale, protéger les entérocytes contre l'apoptose et permettre le retour à l'homéostasie (Vereecke *et al.*, 2010). Le facteur $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ est dégradé lors de la signalisation TLR : sa synthèse *de novo* permet donc de séquestrer à nouveau toute molécule de NF- κB libre (Kawai et Akira, 2010). ATF3 est un facteur de transcription qui inhibe la transcription dépendante de TLR et NF- κB de gènes pro-inflammatoires comme *I/6*, *Cxcl1* et *Cxcl2*, plus particulièrement dans le tractus respiratoire lors de réactions inflammatoires (Gilchrist *et al.*, 2008). Le dernier point de contrôle de la réaction pro-inflammatoire repose sur le gène *Zfp36* codant la Tristetraproline qui déstabilise les mRNA de certains gènes pro-inflammatoires comme *Tnf* ou *Csf2* (Alexopoulou et Kontoyiannis, 2005). Ces mécanismes peuvent être à l'origine du phénomène de tolérance à la flagelline que nous avons observé dans le poumon. Cette tolérance bien connue pour le LPS fait que lorsqu'une cellule est stimulée par un agoniste TLR, elle devient réfractaire à une seconde stimulation et prévient ainsi l'exacerbation de réponses inflammatoires (Kawai et Akira, 2010). Le tissu pulmonaire qui subit un assaut microbien et une infiltration massive de phagocytes nécessite la mise en oeuvre de système de réparation, en particulier des cellules épithéliales qui compartimentent l'arbre respiratoire. Dans le modèle d'instillation nasale de flagelline, différents gènes candidats dans la réparation cellulaire ont été isolés par puces à ADN. Ainsi, les gènes codant l'amphiréguline (*Areg*), la protéine de stress GADD45 β et le facteur de la famille TGF β : GDF15 sont caractéristiques de processus de prolifération cellulaire et de réparation cellulaire. De récents travaux ont montré qu'un traitement à la flagelline sur des cellules épithéliales intestinales en monocouche ayant subi une abrasion, stimule la survie, la prolifération des cellules et la réparation de la lésion (Shaykhiev *et al.*, 2008). Dans le modèle d'injection systémique, l'analyse des puces à ADN réalisées sur le tissu iléal a également révélé la présence de facteurs responsables de la restauration tissulaire, similaires au modèle d'administration muqueuse ainsi que de nouveaux candidats comme l'épiréguline, facteur de croissance épithélial, les inhibiteurs d'apoptose BCL3 et BIRC3, ou les protéines augmentant les fonctions de barrière épithéliale TFF2, SPRR1A ou SPRR2I (Article 3).

Thérapie anti-infectieuse locale par les agonistes TLR

Nos résultats montrent qu'un traitement nasal par la flagelline protège les souris infectées par *S. pneumoniae* et que l'effet thérapeutique est médié par les neutrophiles. Ces phagocytes activés par les médiateurs épithéliaux ont un large spectre d'activité microbicide et représentent des effecteurs puissants contre les infections. De plus, ils survivent au moins 48 heures au sein de la muqueuse dans le compartiment broncho-alvéolaire mais également dans le parenchyme assurant ainsi une clairance locale et prévenant la dissémination systémique. L'intérêt d'une telle thérapie est d'accélérer et d'amplifier la réponse innée qui

pourrait éventuellement apparaître dans l'infection naturelle. De plus, l'architecture du tractus respiratoire se régénère rapidement dans ce traitement. Récemment, la flagelline de *P. aeruginosa* a été utilisée par voie nasale pour traiter une infection respiratoire par la même bactérie (Yu *et al.*, 2010). Dans cette étude, l'expression d'IL-22 est également augmentée, suggérant une translocation de la flagelline dans le chorion de la muqueuse et l'activation de cellules hématopoïétiques. De façon surprenante, l'effet thérapeutique ne repose pas sur les neutrophiles mais sur le peptide anti-microbien CRAMP. Ces données suggèrent que la détection des flagellines dépend de facteurs additionnels à TLR5. Par exemple, une détection spécifique de la flagelline de *P. aeruginosa* par NLRC4 ou l'utilisation de co-récepteurs uniques pourraient apporter de nouvelles spécificités à la réponse innée. D'autres composés complexes contenant de nombreux MAMP comme des lysats d'*H. influenzae* (NTHi) ont été utilisés en thérapie anti-infectieuse dans des modèles bactériens incluant *S. pneumoniae*, fongiques et viraux (Evans *et al.*, 2010; Nempont *et al.*, 2008). L'utilisation de flagelline ou d'autres MAMP conjointement à un traitement antibiotique d'attaque permettrait une diminution de la charge bactérienne par l'antibiotique et une réponse immunitaire innée amplifiée par la flagelline. L'intérêt d'une telle thérapie serait la réparation des tissus abîmés par l'infection grâce à la signalisation TLR (voir ci-dessus) et l'élaboration d'une réponse adaptative effective contre le pathogène grâce à l'effet adjuvant muqueux de la flagelline.

La réponse IL-17 et IL-22 signale l'invasion des muqueuses

Dans notre modèle d'injection systémique, la flagelline est introduite dans le compartiment interne où elle peut interagir avec les récepteurs TLR5 présents sur les cellules de *lamina propria*, sur le pôle baso-latéral des cellules épithéliales. Deux réponses vont alors agir en complément ou synergie pour défendre l'organisme : une réponse épithéliale comparable à celle du modèle d'administration muqueuse et une réponse lymphoïde spécifique à la *lamina propria*. Cette dernière repose sur l'activation de CLI CD3^{neg}CD127⁺ qui sécrètent les cytokines IL-17 et IL-22 par des DC TLR5⁺. Ces cytokines vont également stimuler les défenses épithéliales, en outre par la production de nouvelles molécules de défense comme S100A, lipocaline 2, hepcidine, etc. Les DC de la *lamina propria* intestinale développent une réponse exclusive à la flagelline (Uematsu *et al.*, 2008; Uematsu *et al.*, 2006). Cette particularité en font des sentinelles spécifiques pour détecter une invasion par des bactéries produisant un flagelle et alerter l'hôte d'une menace nouvelle. La tâche des CLI est de provoquer une décharge immédiate des cytokines IL-17 et IL-22 pour protéger la muqueuse. Cette synthèse cytokinique pourrait également être à l'origine d'une empreinte immunologique sur la réponse T, favorisant de ce fait l'émergence préférentielle de lymphocytes Th17 dans les muqueuses (Pepper *et al.*, 2010; Sellge *et al.*, 2010). En effet, des CLI produisant rapidement les cytokines Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13) en réponse à des helminthes ont récemment été identifiées dans l'intestin ou des structures

lymphoïdes associées (Neill *et al.*, 2010; Saenz *et al.*, 2010). Ces CLI intestinales productrices de cytokines Th2 permettent une clairance rapide de *Nippostrongylus brasiliensis* ou *Trichuris muris* au niveau intestinal. L'hypothèse avancée par ces travaux est que les CLI ont deux fonctions : (1) produire immédiatement des cytokines Th effectrices dans la phase innée de la réponse anti-infectieuse et (2) conditionner le développement des lymphocytes Th. Ce processus d'empreinte immunologique par synthèse précoce de cytokines Th (par une population de cellules lymphoïdes) a précisément été décrit dans le modèle d'infection par *Leishmania major* (Himmelrich *et al.*, 2000). Dans le modèle avec la flagelline, nous proposons que la réponse précoce IL-17/IL-22 des CLI signale l'identité du pathogène et d'un processus d'invasion muqueuse, participe à la clairance immédiate des pathogènes et programme la différenciation Th17.

La chimiokine CCL20 : quel est son rôle dans l'immunité muqueuse ?

CCL20 a été initialement montré comme chimiokine spécifique des CPA (monocytes et DC) (Pichavant *et al.*, 2006; Vanbervliet *et al.*, 2002). Plusieurs études ont ainsi établi qu'à l'homéostasie, en vaccination ou lors de processus inflammatoires chroniques, la production épithéliale de CCL20 participe au recrutement de CPA (Cook *et al.*, 2000; Dieu-Nosjean *et al.*, 2000; Iwasaki et Kelsall, 2000; Le Borgne *et al.*, 2006; Pichavant *et al.*, 2006; Sierro *et al.*, 2001). Dans nos expériences d'instillation intranasale, CCL20 est fortement exprimée en réponse à la flagelline (Article 2). Cependant, la déficience en CCR6 dans le compartiment hématopoïétique (et par conséquent dans les CPA) n'a pas d'impact sur la réponse adjuvante (Figure 19). Ces résultats suggèrent que l'effet adjuvant de la flagelline ne repose pas sur le recrutement de CPA ou d'autres cellules exprimant CCR6. Quel rôle peut donc jouer CCL20 dans le contexte muqueux ? Nous avons sélectionné trois hypothèses principales qui mériteraient d'être éprouvées : (1) une activité anti-microbienne, (2) une activité chimiotactique sur la réponse innée et adaptative exprimant les cytokines Th17, (3) un effet sur les cellules B, et (4) un rôle dans l'ontogenèse de tissus lymphoïdes. Dès sa caractérisation, il a été noté que CCL20 présente des homologies structurales avec la β -défensine HBD2 (Perez-Canadillas *et al.*, 2001). Dans des essais *in vitro*, CCL20 a montré un potentiel bactéricide significatif (Sperandio *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2003). La seconde hypothèse est basée sur le fait que les cellules Th17 et les CLI productrices d'IL-17 et d'IL-22 expriment CCR6 (Cua et Tato, 2010). CCL20 pourrait donc mobiliser ces cellules à l'épithélium. Un tel mécanisme permettrait d'anticiper, au point où une invasion microbienne aurait l'opportunité de se développer, le positionnement des CLI pour une défense innée et celui des cellules Th17 pour l'immunité adaptative. Le recrutement de cellules B par une production épithéliale de CCL20 dépendante de TLR favorise le développement de réponse en anticorps IgA en présence de co-facteurs (Shang *et al.*, 2008). Finalement, CCL20 pourrait participer à l'organisation temporaire de plateforme de présentation antigénique (similaire à du tissu lymphoïde diffus ou isolé incluant des CPA et des cellules T et B) dans la

muqueuse inflammée par le recrutement de cellules LT α i (dont certaines CL α I apparentées) qui expriment CCR6. Un tel mécanisme a été proposé pour l'intestin à l'homéostasie suite à une stimulation avec un agoniste de Nod1 (Bouskra *et al.*, 2008). La synthèse de CCL20 dans l'épithélium en réponse à la flagelline est temporaire contrairement à d'autres stimuli comme la cytokine LT β ou les bactéries commensales qui induisent une expression permanente dans l'épithélium (Bouskra *et al.*, 2008; Rumbo *et al.*, 2004; Sirard *et al.*, 2009).

Réponse adaptative sans activation directe des CPA par les TLR

Un modèle d'activation de la réponse adaptative par les agonistes TLR administrés par voie systémique a été élaboré par le groupe du Dr. Reis e Sousa (Joffre *et al.*, 2009; Nolte *et al.*, 2007; Sporri et Reis e Sousa, 2005). Une réponse adaptative, et plus particulièrement, l'activation des lymphocytes T et B, dépend strictement de l'activation directe des CPA par les TLR. De plus, une trans-activation par les médiateurs pro-inflammatoires tels TNF α ou IL-6 produits par des cellules hématopoïétiques ou structurales stimulées par des agonistes TLR ne permet pas l'activation fonctionnelle des CPA et des lymphocytes. La flagelline, comme d'autres agonistes TLR, est connue pour activer les CPA, en particulier les cellules dendritiques dans un mécanisme dépendant de TLR5 (Didierlaurent *et al.*, 2004; Feuillet *et al.*, 2006). Dans ce travail de thèse, le développement de la réponse adaptative par la voie intranasale avec la flagelline ne repose pas sur une activation directe des CPA via TLR5. En effet, malgré que le compartiment hématopoïétique est capable de répondre via TLR5, l'administration muqueuse de flagelline n'induit pas de réponse adaptative. Dans le modèle pulmonaire avec du LPS, la signalisation épithéliale via TLR4 participe à l'immunité adaptative par le recrutement spécifique de cellules dendritiques (Hammad *et al.*, 2009). Ces résultats montrent donc que les récepteurs TLR peuvent conditionner l'épithélium à orchestrer tous les signaux nécessaires au recrutement et à l'activation fonctionnelle des CPA.

Les chimiokines épithéliales capables de recruter des CPA sont principalement CCL20 et CCL2. L'association de CCL20 avec le recrutement de CPA et l'immunité muqueuse a été remarquée dans divers épithéliums à l'homéostasie comme dans les plaques de Peyer (Cook *et al.*, 2000; Iwasaki et Kelsall, 2000) et lors de stress inflammatoires dans les amygdales ou l'intestin (Charbonnier *et al.*, 1999; Dieu-Nosjean *et al.*, 2000; Sierro *et al.*, 2001). Lors de traitements vaccinaux, le recrutement *de novo* de DC via CCL20 peut également permettre l'émergence d'une immunité spécifique (Le Borgne *et al.*, 2006). Nos premiers résultats suggèrent qu'en absence de CCR6 sur les CPA, les propriétés adjuvantes de la flagelline ne sont pas affectées. L'analyse du transcriptome a montré que le tissu pulmonaire, en réponse à la flagelline, expriment les chimiokines CCL2, CCL3 et CCL7 spécifiques des monocytes et des DC (Serbina *et al.*, 2008; Vanbervliet *et al.*, 2002). Récemment, le récepteur de ces chimiokines, i.e. CCR2 a été montré comme

essentiel au recrutement dans le poumon de populations monocytaires qui donnent naissance à des DC (Hohl *et al.*, 2009; Jakubzick *et al.*, 2008). Dans les tissus muqueux, les cellules épithéliales peuvent également produire des facteurs participant à l'activation fonctionnelle des CPA, i.e. capacité à migrer dans les sites inducteurs de l'immunité, capacité à exprimer des molécules de stimulation et à présenter les antigènes. Nous avons défini par la signature transcriptionnelle que le facteur GM-CSF (CSF2) est surexprimé en présence de flagelline. Ce facteur est connu pour promouvoir le développement de précurseurs myéloïdes en DC (Auffray *et al.*, 2009). Une récente étude propose que le GM-CSF régule la survie des DC intestinales (Hirata *et al.*, 2010). Les prochaines études du laboratoire devront s'intéresser à définir la nature des CPA et des signaux d'activation requis pour la réponse adaptative orchestrée par l'épithélium. Il faut tout de même garder en tête que les cellules recrutées dans les conditions inflammatoires dépendante de la signalisation TLR sont peut être pré-activées et donc prêtes à fonctionner comme CPA.

Il a été proposé que la présence simultanée des agonistes TLR avec l'antigène soit essentielle à leur effet adjuvant, en favorisant la maturation fonctionnelle des CPA (Blander, 2007). Cet effet "cargo" suppose qu'adjuvant et antigène signalent au sein d'un même phagosome afin que l'antigène soit apprêté et présenté efficacement sur une molécule de CMHII. Ce concept s'est traduit par la création de peptides de fusion couplant un antigène à la flagelline (Bargieri *et al.*, 2010; Huleatt *et al.*, 2007; Huleatt *et al.*, 2008). Au vu de nos résultats, il apparaît que la signalisation TLR est épithéliale alors que les CPA sont nécessaires à l'effet adjuvant : le couplage physique de la flagelline à son antigène et par conséquent un effet "cargo" ne semblent donc pas requis pour l'adjuvantité par la voie d'immunisation intranasale.

Mode d'action des adjuvants flagelline et alum : commun ou distinct?

Les adjuvants sont des composés biochimiques présents dans de nombreux vaccins afin d'augmenter, de maintenir et de moduler la réponse immunitaire adaptative vis-à-vis d'un antigène (Lambrecht *et al.*, 2009; Palm et Medzhitov, 2009). De plus, ils permettent de diminuer la quantité d'antigène et le nombre d'injections nécessaires à l'acquisition de l'immunité. L'alum, ou sel d'aluminium sous forme d'hydroxyde ou de phosphate, est l'adjuvant le plus utilisé (longtemps le seul) en clinique. Par voie d'administration locale, la flagelline cible les cellules épithéliales et la signalisation TLR5. De même, l'alum, injecté par voie intra-musculaire « cible » les myocytes et NLRP3. Le récepteur NLRP3 détecte un signal de danger endogène : l'acide urique qui est généré par la toxicité de l'alum sur les myocytes (Eisenbarth *et al.*, 2008; Kool *et al.*, 2008). L'activation de NLRP3 déclenche alors la maturation de l'IL-1 β . Dans ces 2 expérimentations, l'effet adjuvant est donc associé à une signalisation innée dans les cellules structurales et la production de chimiokines, cytokines et médiateurs pro-inflammatoires. Cependant, l'IL-1 β ne semble pas nécessaire à l'effet

adjuvant car les animaux *MyD88*^{-/-} (déficients pour la signalisation via TLR et IL-1 β) répondent parfaitement à l'immunisation avec l'alum (Eisenbarth *et al.*, 2008; Gavin *et al.*, 2006). Dans le cadre de la vaccination nasale avec la flagelline, nous avons montré que des souris dont le compartiment hématopoïétique est déficient pour MyD88 développent parfaitement une réponse en anticorps. Ce résultat suggère que l'IL-1 β n'est pas nécessaire en tant que médiateur inflammatoire à l'activité adjuvante de la flagelline. De plus, le laboratoire a montré qu'une flagelline recombinante mutée dans le motif de signalisation nécessaire à TLR5 n'avait pas d'activité adjuvante, et ce malgré la présence du motif de signalisation NLRC4, ce qui exclut tout rôle des NLR dans ce processus (Nempont *et al.*, 2008).

Le pouvoir adjuvant de l'alum a été associé à des monocytes inflammatoires CD11b⁺Ly6C⁺ qui se différencient en DC inflammatoires dans les ganglions drainants le site d'immunisation (Kool *et al.*, 2008). L'adjuvant AS04 développé par Glaxo Smith Kline®, utilisé en clinique dans des vaccins tels que Cervarix® ou Fendrix®, est constitué d'un agoniste de TLR4, le monophosphoryl lipide A associé à un sel d'aluminium. Des études chez la souris ont montré que l'agoniste TLR4 augmente le recrutement de CPA dont des monocytes et des DC (Didierlaurent *et al.*, 2009). Il est remarquable que la flagelline induit un recrutement de monocytes inflammatoires CD11b⁺Ly6C⁺CX₃CR1⁺ au sein du tissu pulmonaire et des ganglions médiastinaux (Figure 18). Dans les expériences futures, le rôle de ces cellules dans la capture et présentation antigénique sera donc exploré. Il apparaît également crucial de définir si ce mode d'action de la flagelline est unique à la muqueuse respiratoire ou s'il opère dans d'autres voie comme la voie sous-cutanée.

La découverte des TLR a près de 15 ans et la révolution annoncée par le potentiel thérapeutique et vaccinal de ces agonistes n'est encore qu'à ses débuts. La dissection des mécanismes d'action d'adjuvants TLR représentera une avancée majeure pour le développement de vaccins. De même, l'exploitation des agonistes TLR à des fins thérapeutiques pourrait donner un second souffle à l'antibiothérapie.

BIBLIOGRAPHIE

- Abreu, M. T. (2010). "Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function." *Nat Rev Immunol* 10: 131-44.
- Adamo, R., S. Sokol, G. Soong, M. Gomez and A. Prince (2004). "*Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5." *Am J Respir Cell Mol Biol* 30: 627-34.
- Agrawal, S., A. Agrawal, B. Doughty, A. Gerwitz, J. Blenis, T. Van Dyke and B. Pulendran (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 c-Fos." *J Immunol* 171: 4984-9.
- Akashi, S., S. Saitoh, Y. Wakabayashi, T. Kikuchi, N. Takamura, Y. Nagai, Y. Kusumoto, K. Fukase, S. Kusumoto, Y. Adachi, A. Kosugi and K. Miyake (2003). "Lipopolysaccharide interaction with cell surface Toll-like receptor 4-MD-2: higher affinity than that with MD-2 or CD14." *J Exp Med* 198: 1035-42.
- Akira, S., S. Uematsu and O. Takeuchi (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." *Cell* 124: 783-801.
- Albiger, B., A. Sandgren, H. Katsuragi, U. Meyer-Hoffert, K. Beiter, F. Wartha, M. Hornef, S. Normark and B. H. Normark (2005). "Myeloid differentiation factor 88-dependent signalling controls bacterial growth during colonization and systemic pneumococcal disease in mice." *Cell Microbiol* 7: 1603-15.
- Alexopoulou, L. and D. Kontoyiannis (2005). "Contribution of microbial-associated molecules in innate mucosal responses." *Cell Mol Life Sci* 62: 1349-58.
- Amer, A., L. Franchi, T. D. Kanneganti, M. Body-Malapel, N. Ozoren, G. Brady, S. Meshinchi, R. Jagirdar, A. Gewirtz, S. Akira and G. Nunez (2006). "Regulation of Legionella phagosome maturation and infection through flagellin and host Ipaf." *J Biol Chem* 281: 35217-23.
- Ancuta, P., R. Rao, A. Moses, A. Mehle, S. K. Shaw, F. W. Luscinskas and D. Gabuzda (2003). "Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes." *J Exp Med* 197: 1701-7.
- Andersen-Nissen, E., T. R. Hawn, K. D. Smith, A. Nachman, A. E. Lampano, S. Uematsu, S. Akira and A. Aderem (2007a). "TLR5-/- mice are more susceptible to Escherichia coli urinary tract infection." *J Immunol* 178: 4717-20.
- Andersen-Nissen, E., K. D. Smith, R. Bonneau, R. K. Strong and A. Aderem (2007b). "A conserved surface on Toll-like receptor 5 recognizes bacterial flagellin." *J Exp Med* 204: 393-403.
- Andersen-Nissen, E., K. D. Smith, K. L. Strobe, S. L. Barrett, B. T. Cookson, S. M. Logan and A. Aderem (2005). "Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 9247-52.
- Anderson, K. V., L. Bokla and C. Nusslein-Volhard (1985). "Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product." *Cell* 42: 791-8.
- Andoh, A., Z. Zhang, O. Inatomi, S. Fujino, Y. Deguchi, Y. Araki, T. Tsujikawa, K. Kitoh, S. Kim-Mitsuyama, A. Takayanagi, N. Shimizu and Y. Fujiyama (2005). "Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts." *Gastroenterology* 129: 969-84.
- Auffray, C., M. H. Sieweke and F. Geissmann (2009). "Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells." *Annu Rev Immunol* 27: 669-92.
- Aujla, S. J., Y. R. Chan, M. Zheng, M. Fei, D. J. Askew, D. A. Pociask, T. A. Reinhart, F. McAllister, J. Edeal, K. Gaus, S. Husain, J. L. Kreindler, P. J. Dubin, J. M. Pilewski, M. M. Myerburg, C. A. Mason, Y. Iwakura and J. K. Kolls (2008). "IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia." *Nat Med* 14: 275-81.
- Bambou, J. C., A. Giraud, S. Menard, B. Begue, S. Rakotobe, M. Heyman, F. Taddei, N. Cerf-Bensussan and V. Gaboriau-Routhiau (2004). "In vitro and ex vivo activation of the TLR5 signaling pathway in intestinal epithelial cells by a commensal Escherichia coli strain." *J Biol Chem* 279: 42984-92.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." *Nature* 392: 245-52.
- Bargieri, D. Y., J. A. Leite, S. C. Lopes, M. E. Sbrogio-Almeida, C. J. Braga, L. C. Ferreira, I. S. Soares, F. T. Costa and M. M. Rodrigues (2010). "Immunogenic properties of a recombinant fusion protein containing the C-terminal 19 kDa of Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 and the innate immunity agonist FltC flagellin of Salmonella typhimurium." *Vaccine* 28: 2818-26.
- Bates, J. T., S. Uematsu, S. Akira and S. B. Mizel (2009). "Direct stimulation of TLR5+/+ CD11c+ cells is necessary for the adjuvant activity of flagellin." *J Immunol* 182: 7539-47.
- Bell, J. K., G. E. Mullen, C. A. Leifer, A. Mazzoni, D. R. Davies and D. M. Segal (2003). "Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors." *Trends Immunol* 24: 528-33.
- Belvin, M. P. and K. V. Anderson (1996). "A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway." *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 393-416.
- Berin, M. C., A. Darfeuille-Michaud, L. J. Egan, Y. Miyamoto and M. F. Kagnoff (2002). "Role of EHEC O157:H7 virulence factors in the activation of intestinal epithelial cell NF-kappaB and MAP kinase pathways and the upregulated expression of interleukin 8." *Cell Microbiol* 4: 635-48.
- Blander, J. M. (2007). "Coupling Toll-like receptor signaling with phagocytosis: potentiation of antigen presentation." *Trends Immunol* 28: 19-25.
- Boniface, K., F. X. Bernard, M. Garcia, A. L. Gurney, J. C. Lecron and F. Morel (2005). "IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes." *J Immunol* 174: 3695-702.
- Boone, D. L., E. E. Turer, E. G. Lee, R. C. Ahmad, M. T. Wheeler, C. Tsui, P. Hurley, M. Chien, S. Chai, O. Hitotsumatsu, E. McNally, C. Pickart and A. Ma (2004). "The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses." *Nat Immunol* 5: 1052-60.
- Bouskra, D., C. Brezillon, M. Berard, C. Werts, R. Varona, I. G. Boneca and G. Eberl (2008). "Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis." *Nature* 456: 507-10.
- Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch and A. Zychlinsky (2004). "Neutrophil extracellular traps kill bacteria." *Science* 303: 1532-5.

- Brint, E. K., D. Xu, H. Liu, A. Dunne, A. N. McKenzie, L. A. O'Neill and F. Y. Liew (2004). "ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance." *Nat Immunol* 5: 373-9.
- Brown, K. L. and R. E. Hancock (2006). "Cationic host defense (antimicrobial) peptides." *Curr Opin Immunol* 18: 24-30.
- Burdelya, L. G., V. I. Krivokrysenko, T. C. Tallant, E. Strom, A. S. Gleiberman, D. Gupta, O. V. Kurnasov, F. L. Fort, A. L. Osterman, J. A. Didonato, E. Feinstein and A. V. Gudkov (2008). "An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models." *Science* 320: 226-30.
- Burns, K., S. Janssens, B. Brissoni, N. Olivos, R. Beyaert and J. Tschopp (2003). "Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4." *J Exp Med* 197: 263-8.
- Carballo, E., W. S. Lai and P. J. Blackshear (1998). "Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor- α production by tristetraprolin." *Science* 281: 1001-5.
- Carnoy, C., H. Muller-Alouf, P. Desreumaux, C. Mullet, C. Grangette and M. Simonet (2000). "The superantigenic toxin of *Yersinia pseudotuberculosis*: a novel virulence factor?" *Int J Med Microbiol* 290: 477-82.
- Chabot, S., J. S. Wagner, S. Farrant and M. R. Neutra (2006). "TLRs regulate the gatekeeping functions of the intestinal follicle-associated epithelium." *J Immunol* 176: 4275-83.
- Chan, Y. R., J. S. Liu, D. A. Pociask, M. Zheng, T. A. Mietzner, T. Berger, T. W. Mak, M. C. Clifton, R. K. Strong, P. Ray and J. K. Kolls (2009). "Lipocalin 2 is required for pulmonary host defense against *Klebsiella* infection." *J Immunol* 182: 4947-56.
- Charbonnier, A. S., N. Kohrgruber, E. Kriehuber, G. Stingl, A. Rot and D. Maurer (1999). "Macrophage inflammatory protein 3 α is involved in the constitutive trafficking of epidermal langerhans cells." *J. Exp. Med.* 190: 1755-68.
- Chieppa, M., M. Rescigno, A. Y. Huang and R. N. Germain (2006). "Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement." *J Exp Med* 203: 2841-52.
- Choe, J., M. S. Kelker and I. A. Wilson (2005). "Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain." *Science* 309: 581-5.
- Colonna, M. (2009). "Interleukin-22-producing natural killer cells and lymphoid tissue inducer-like cells in mucosal immunity." *Immunity* 31: 15-23.
- Conti, H. R., F. Shen, N. Nayyar, E. Stocum, J. N. Sun, M. J. Lindemann, A. W. Ho, J. H. Hai, J. J. Yu, J. W. Jung, S. G. Filler, P. Masso-Welch, M. Edgerton and S. L. Gaffen (2009). "Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis." *J Exp Med* 206: 299-311.
- Cook, D. N., D. M. Prosser, R. Forster, J. Zhang, N. A. Kuklin, S. J. Abbondanzo, X. D. Niu, S. C. Chen, D. J. Manfra, M. T. Wiekowski, L. M. Sullivan, S. R. Smith, H. B. Greenberg, S. K. Narula, M. Lipp and S. A. Lira (2000). "CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue." *Immunity* 12: 495-503.
- Craig, A., J. Mai, S. Cai and S. Jeyaseelan (2009). "Neutrophil recruitment to the lungs during bacterial pneumonia." *Infect Immun* 77: 568-75.
- Croker, B. A., B. R. Lawson, S. Rutschmann, M. Berger, C. Eidenschenk, A. L. Blasius, E. M. Moresco, S. Sovath, L. Cengia, L. D. Shultz, A. N. Theofilopoulos, S. Pettersson and B. A. Beutler (2008). "Inflammation and autoimmunity caused by a SHP1 mutation depend on IL-1, MyD88, and a microbial trigger." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 15028-33.
- Cua, D. J. and C. M. Tato (2010). "Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system." *Nat Rev Immunol* 10: 479-89.
- Cunningham, A. F., M. Khan, J. Ball, K. M. Toellner, K. Serre, E. Mohr and I. C. MacLennan (2004). "Responses to the soluble flagellar protein FlhC are Th2, while those to FlhC on *Salmonella* are Th1." *Eur J Immunol* 34: 2986-95.
- de Vos, A. F., J. M. Pater, P. S. van den Pangaart, M. D. de Kruif, C. van 't Veer and T. van der Poll (2009). "In vivo lipopolysaccharide exposure of human blood leukocytes induces cross-tolerance to multiple TLR ligands." *J Immunol* 183: 533-42.
- Didierlaurent, A., I. Ferrero, L. A. Otten, B. Dubois, M. Reinhardt, H. Carlsen, R. Blomhoff, S. Akira, J. P. Kraehenbuhl and J. C. Sirard (2004). "Flagellin Promotes Myeloid Differentiation Factor 88-Dependent Development of Th2-Type Response." *J Immunol* 172: 6922-30.
- Didierlaurent, A., J. Goulding, S. Patel, R. Snelgrove, L. Low, M. Bebien, T. Lawrence, L. S. van Rijt, B. N. Lambrecht, J. C. Sirard and T. Hussell (2008). "Sustained desensitization to bacterial Toll-like receptor ligands after resolution of respiratory influenza infection." *J Exp Med* 205: 323-9.
- Didierlaurent, A. M., S. Morel, L. Lockman, S. L. Giannini, M. Bisteau, H. Carlsen, A. Kielland, O. Vosters, N. Vanderheyde, F. Schiavetti, D. Larocque, M. Van Mechelen and N. Garcon (2009). "AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity." *J Immunol* 183: 6186-97.
- Dieu, M. C., B. Vanbervliet, A. Vicari, J. M. Bridon, E. Oldham, S. Ait-Yahia, F. Briere, A. Zlotnik, S. Lebecque and C. Caux (1998). "Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites." *J. Exp. Med.* 188: 373-86.
- Dieu-Nosjean, M. C., C. Massacrier, B. Homey, B. Vanbervliet, J. J. Pin, A. Vicari, S. Lebecque, C. Dezutter-Dambuyant, D. Schmitt, A. Zlotnik and C. Caux (2000). "Macrophage inflammatory protein 3 α is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors." *J. Exp. Med.* 192: 705-18.
- Drake, D. and T. C. Montie (1988). "Flagella, motility and invasive virulence of *Pseudomonas aeruginosa*." *J Gen Microbiol* 134: 43-52.

- Duhen, T., R. Geiger, D. Jarrossay, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2009). "Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells." *Nat Immunol* 10: 857-63.
- Dumoutier, L., E. Van Roost, D. Colau and J. C. Renauld (2000). "Human interleukin-10-related T cell-derived inducible factor: molecular cloning and functional characterization as an hepatocyte-stimulating factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10144-9.
- Eaves-Pyles, T., K. Murthy, L. Liaudet, L. Virag, G. Ross, F. G. Soriano, C. Szabo and A. L. Salzman (2001). "Flagellin, a novel mediator of Salmonella-induced epithelial activation and systemic inflammation: I kappa B alpha degradation, induction of nitric oxide synthase, induction of proinflammatory mediators, and cardiovascular dysfunction." *J Immunol* 166: 1248-60.
- Eckmann, L. and M. F. Kagnoff (2001). "Cytokines in host defense against Salmonella." *Microbes Infect* 3: 1191-200.
- Eckmann, L., M. F. Kagnoff and J. Fierer (1993). "Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry." *Infect Immun* 61: 4569-74.
- Edwards, A. D., S. S. Diebold, E. M. Slack, H. Tomizawa, H. Hemmi, T. Kaisho, S. Akira and C. Reis e Sousa (2003). "Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines." *Eur J Immunol* 33: 827-33.
- Eisenbarth, S. C., O. R. Colegio, W. O'Connor, F. S. Sutterwala and R. A. Flavell (2008). "Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants." *Nature* 453: 1122-6.
- Evans, S. E., Y. Xu, M. J. Tuvim and B. F. Dickey (2010). "Inducible innate resistance of lung epithelium to infection." *Annu Rev Physiol* 72: 413-35.
- Faraoni, I., F. R. Antonetti, J. Cardone and E. Bonmassar (2009). "miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA." *Biochim Biophys Acta* 1792: 497-505.
- Feuillet, V., S. Medjane, I. Mondor, O. Demaria, P. P. Pagni, J. E. Galan, R. A. Flavell and L. Alexopoulou (2006). "Involvement of Toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 12487-92.
- Fritz, J. H., L. Le Bourhis, J. G. Magalhaes and D. J. Philpott (2008). "Innate immune recognition at the epithelial barrier drives adaptive immunity: APCs take the back seat." *Trends Immunol* 29: 41-9.
- Fritz, J. H., L. Le Bourhis, G. Sellge, J. G. Magalhaes, H. Fsihi, T. A. Kufer, C. Collins, J. Viala, R. L. Ferrero, S. E. Girardin and D. J. Philpott (2007). "Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity." *Immunity* 26: 445-59.
- Froy, O. (2005). "Regulation of mammalian defensin expression by Toll-like receptor-dependent and independent signalling pathways." *Cell Microbiol* 7: 1387-97.
- Gaboriau-Routhiau, V., S. Rakotobe, E. Lecuyer, I. Mulder, A. Lan, C. Bridonneau, V. Rochet, A. Pisi, M. De Paepe, G. Brandi, G. Eberl, J. Snel, D. Kelly and N. Cerf-Bensussan (2009). "The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses." *Immunity* 31: 677-89.
- Gaffen, S. L. (2009). "Structure and signalling in the IL-17 receptor family." *Nat Rev Immunol* 9: 556-67.
- Gautier, G., M. Humbert, F. Deauvieu, M. Scuiller, J. Hiscott, E. E. Bates, G. Trinchieri, C. Caux and P. Garrone (2005). "A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells." *J Exp Med* 201: 1435-46.
- Gavin, A. L., K. Hoebe, B. Duong, T. Ota, C. Martin, B. Beutler and D. Nemazee (2006). "Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling." *Science* 314: 1936-8.
- Gay, N. J. and F. J. Keith (1991). "Drosophila Toll and IL-1 receptor." *Nature* 351: 355-6.
- Geissmann, F., S. Jung and D. R. Littman (2003). "Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties." *Immunity* 19: 71-82.
- Geissmann, F., M. G. Manz, S. Jung, M. H. Sieweke, M. Merad and K. Ley (2010). "Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells." *Science* 327: 656-61.
- Gewirtz, A. T., T. A. Navas, S. Lyons, P. J. Godowski and J. L. Madara (2001). "Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression." *J Immunol* 167: 1882-5.
- Gilchrist, M., W. R. Henderson, Jr., A. E. Clark, R. M. Simmons, X. Ye, K. D. Smith and A. Aderem (2008). "Activating transcription factor 3 is a negative regulator of allergic pulmonary inflammation." *J Exp Med* 205: 2349-57.
- Gilchrist, M., V. Thorsson, B. Li, A. G. Rust, M. Korb, J. C. Roach, K. Kennedy, T. Hai, H. Bolouri and A. Aderem (2006). "Systems biology approaches identify ATF3 as a negative regulator of Toll-like receptor 4." *Nature* 441: 173-8.
- Giraud, A., S. Arous, M. De Paepe, V. Gaboriau-Routhiau, J. C. Bambou, S. Rakotobe, A. B. Lindner, F. Taddei and N. Cerf-Bensussan (2008). "Dissecting the genetic components of adaptation of Escherichia coli to the mouse gut." *PLoS Genet* 4: e2.
- Giron, J. A., A. G. Torres, E. Freer and J. B. Kaper (2002). "The flagella of enteropathogenic Escherichia coli mediate adherence to epithelial cells." *Mol Microbiol* 44: 361-79.
- Godaly, G., G. Bergsten, B. Frendeus, L. Hang, M. Hedlund, D. Karpman, P. Samuelsson, M. Svensson, G. Otto, B. Wullt and C. Svanborg (2000). "Innate defences and resistance to gram negative mucosal infection." *Adv Exp Med Biol* 485: 9-24.
- Gordon, S. and P. R. Taylor (2005). "Monocyte and macrophage heterogeneity." *Nat Rev Immunol* 5: 953-64.
- Gribar, S. C., R. J. Anand, C. P. Sodhi and D. J. Hackam (2008). "The role of epithelial Toll-like receptor signaling in the pathogenesis of intestinal inflammation." *J Leukoc Biol* 83: 493-8.
- Gwinn, M. R. and V. Vallyathan (2006). "Respiratory burst: role in signal transduction in alveolar macrophages." *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 9: 27-39.
- Hammad, H., M. Chieppa, F. Perros, M. A. Willart, R. N. Germain and B. N. Lambrecht (2009). "House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells." *Nat Med* 15: 410-6.

- Hasan, U., C. Chaffois, C. Gaillard, V. Saulnier, E. Merck, S. Tancredi, C. Guet, F. Briere, J. Vlach, S. Lebecque, G. Trinchieri and E. E. Bates (2005). "Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88." *J Immunol* 174: 2942-50.
- Hawn, T. R., A. Verbon, K. D. Lettinga, L. P. Zhao, S. S. Li, R. J. Laws, S. J. Skerrett, B. Beutler, L. Schroeder, A. Nachman, A. Ozinsky, K. D. Smith and A. Aderem (2003). "A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease." *J Exp Med* 198: 1563-72.
- 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: 1099-103.
- Hayday, A. C. (2009). "Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response." *Immunity* 31: 184-96.
- He, B., W. Xu, P. A. Santini, A. D. Polydorides, A. Chiu, J. Estrella, M. Shan, A. Chadburn, V. Villanacci, A. Plebani, D. M. Knowles, M. Rescigno and A. Cerutti (2007). "Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL." *Immunity* 26: 812-26.
- Himmelrich, H., P. Launois, I. Maillard, T. Biedermann, F. Tacchini-Cottier, R. M. Locksley, M. Rocken and J. A. Louis (2000). "In BALB/c mice, IL-4 production during the initial phase of infection with *Leishmania major* is necessary and sufficient to instruct Th2 cell development resulting in progressive disease." *J Immunol* 164: 4819-25.
- Hirata, Y., L. Egea, S. M. Dann, L. Eckmann and M. F. Kagnoff (2010). "GM-CSF-facilitated dendritic cell recruitment and survival govern the intestinal mucosal response to a mouse enteric bacterial pathogen." *Cell Host Microbe* 7: 151-63.
- Hohl, T. M., A. Rivera, L. Lipuma, A. Gallegos, C. Shi, M. Mack and E. G. Pamer (2009). "Inflammatory monocytes facilitate adaptive CD4 T cell responses during respiratory fungal infection." *Cell Host Microbe* 6: 470-81.
- Holt, P. G., J. Oliver, N. Bilyk, C. McMenamin, P. G. McMenamin, G. Kraal and T. Thepen (1993). "Downregulation of the antigen presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages." *J Exp Med* 177: 397-407.
- Holt, P. G., D. H. Strickland, M. E. Wikstrom and F. L. Jahnsen (2008). "Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract." *Nat Rev Immunol* 8: 142-52.
- Honko, A. N. and S. B. Mizel (2004). "Mucosal administration of flagellin induces innate immunity in the mouse lung." *Infect Immun* 72: 6676-9.
- Honko, A. N., N. Sriranganathan, C. J. Lees and S. B. Mizel (2006). "Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*." *Infect Immun* 74: 1113-20.
- Hooper, L. V. and A. J. Macpherson (2010). "Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota." *Nat Rev Immunol* 10: 159-69.
- Hughes, E. A. and J. E. Galan (2002). "Immune response to *Salmonella*: location, location, location?" *Immunity* 16: 325-8.
- Huleatt, J. W., A. R. Jacobs, J. Tang, P. Desai, E. B. Kopp, Y. Huang, L. Song, V. Nakaar and T. J. Powell (2007). "Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity." *Vaccine* 25: 763-75.
- Huleatt, J. W., V. Nakaar, P. Desai, Y. Huang, D. Hewitt, A. Jacobs, J. Tang, W. McDonald, L. Song, R. K. Evans, S. Umlauf, L. Tussey and T. J. Powell (2008). "Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin." *Vaccine* 26: 201-14.
- Ishigame, H., S. Kakuta, T. Nagai, M. Kadoki, A. Nambu, Y. Komiyama, N. Fujikado, Y. Tanahashi, A. Akitsu, H. Kotaki, K. Sudo, S. Nakae, C. Sasakawa and Y. Iwakura (2009). "Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucocutaneous bacterial infection and allergic responses." *Immunity* 30: 108-19.
- Iwasaki, A. and B. L. Kelsall (2000). "Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine." *J. Exp. Med.* 191: 1381-94.
- Izadpanah, A., M. B. Dwinell, L. Eckmann, N. M. Varki and M. F. Kagnoff (2001). "Regulated MIP-3alpha/CCL20 production by human intestinal epithelium: mechanism for modulating mucosal immunity." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280: G710-9.
- Jakubzick, C., F. Tacke, F. Ginhoux, A. J. Wagers, N. van Rooijen, M. Mack, M. Merad and G. J. Randolph (2008). "Blood monocyte subsets differentially give rise to CD103+ and CD103- pulmonary dendritic cell populations." *J Immunol* 180: 3019-27.
- Jakubzick, C., F. Tacke, J. Llodra, N. van Rooijen and G. J. Randolph (2006). "Modulation of dendritic cell trafficking to and from the airways." *J Immunol* 176: 3578-84.
- Janot, L., J. C. Sirard, T. Secher, N. Noulain, L. Fick, S. Akira, S. Uematsu, A. Didierlaurent, T. Hussell, B. Ryffel and F. Erard (2009). "Radioresistant cells expressing TLR5 control the respiratory epithelium's innate immune responses to flagellin." *Eur J Immunol* 39: 1587-96.
- Jeffery, P. K. (1987). "The origins of secretions in the lower respiratory tract." *Eur J Respir Dis Suppl* 153: 34-42.
- Joffre, O., M. A. Nolte, R. Sporri and C. Reis e Sousa (2009). "Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity." *Immunol Rev* 227: 234-47.
- Kabelitz, D. (2007). "Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes." *Curr Opin Immunol* 19: 39-45.
- Kagnoff, M. F. and L. Eckmann (1997). "Epithelial cells as sensors for microbial infection." *J Clin Invest* 100: 6-10.

- Kaiser, V. and G. Diamond (2000). "Expression of mammalian defensin genes." *J Leukoc Biol* 68: 779-84.
- Kaisho, T. and S. Akira (2001). "Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice." *Trends Immunol* 22: 78-83.
- Kawagoe, T., O. Takeuchi, Y. Takabatake, H. Kato, Y. Isaka, T. Tsujimura and S. Akira (2009). "TANK is a negative regulator of Toll-like receptor signaling and is critical for the prevention of autoimmune nephritis." *Nat Immunol* 10: 965-72.
- Kawai, T. and S. Akira (2010). "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors." *Nat Immunol* 11: 373-84.
- Khair, O. A., R. J. Davies and J. L. Devalia (1996). "Bacterial-induced release of inflammatory mediators by bronchial epithelial cells." *Eur Respir J* 9: 1913-22.
- Khor, C. C., S. J. Chapman, F. O. Vannberg, A. Dunne, C. Murphy, E. Y. Ling, A. J. Frodsham, A. J. Walley, O. Kyrieleis, A. Khan, C. Aucan, S. Segal, C. E. Moore, K. Knox, S. J. Campbell, C. Lienhardt, A. Scott, P. Aaby, O. Y. Sow, R. T. Grignani, J. Sillah, G. Sirugo, N. Peshu, T. N. Williams, K. Maitland, R. J. Davies, D. P. Kwiatkowski, N. P. Day, D. Yala, D. W. Crook, K. Marsh, J. A. Berkley, L. A. O'Neill and A. V. Hill (2007). "A Mal functional variant is associated with protection against invasive pneumococcal disease, bacteremia, malaria and tuberculosis." *Nat Genet* 39: 523-8.
- Kinugasa, T., T. Sakaguchi, X. Gu and H. C. Reinecker (2000). "Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators." *Gastroenterology* 118: 1001-11.
- Kobayashi, K., L. D. Hernandez, J. E. Galan, C. A. Janeway, Jr., R. Medzhitov and R. A. Flavell (2002). "IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling." *Cell* 110: 191-202.
- Kolls, J. K., P. B. McCray, Jr. and Y. R. Chan (2008). "Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins." *Nat Rev Immunol* 8: 829-35.
- Kool, M., V. Petrilli, T. De Smedt, A. Rolaz, H. Hammad, M. van Nimwegen, I. M. Bergen, R. Castillo, B. N. Lambrecht and J. Tschopp (2008). "Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome." *J Immunol* 181: 3755-9.
- Kotenko, S. V., L. S. Izotova, O. V. Mirochnitchenko, E. Esterova, H. Dickensheets, R. P. Donnelly and S. Pestka (2001). "Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes." *J Biol Chem* 276: 2725-32.
- Krukoni, E. S. and V. J. DiRita (2003). "From motility to virulence: Sensing and responding to environmental signals in *Vibrio cholerae*." *Curr Opin Microbiol* 6: 186-90.
- Ku, C. L., C. Picard, M. Erdos, A. Jeurissen, J. Bustamante, A. Puel, H. von Bernuth, O. Filipe-Santos, H. H. Chang, T. Lawrence, M. Raes, L. Marodi, X. Bossuyt and J. L. Casanova (2007). "IRAK4 and NEMO mutations in otherwise healthy children with recurrent invasive pneumococcal disease." *J Med Genet* 44: 16-23.
- Lambrecht, B. N., M. Kool, M. A. Willart and H. Hammad (2009). "Mechanism of action of clinically approved adjuvants." *Curr Opin Immunol* 21: 23-9.
- Lamkanfi, M., A. Amer, T. D. Kanneganti, R. Munoz-Planillo, G. Chen, P. Vandenabeele, A. Fortier, P. Gros and G. Nunez (2007). "The Nod-like receptor family member Naip5/Birc1e restricts *Legionella pneumophila* growth independently of caspase-1 activation." *J Immunol* 178: 8022-7.
- Lane, M. C., C. J. Alteri, S. N. Smith and H. L. Mobley (2007). "Expression of flagella is coincident with uropathogenic *Escherichia coli* ascension to the upper urinary tract." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 16669-74.
- Le Borgne, M., N. Etchart, A. Goubier, S. A. Lira, J. C. Sirard, N. van Rooijen, C. Caux, S. Ait-Yahia, A. Vicari, D. Kaiserlian and B. Dubois (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 Moigne, V., G. Robreau and W. Mahana (2008). "Flagellin as a good carrier and potent adjuvant for Th1 response: study of mice immune response to the p27 (Rv2108) *Mycobacterium tuberculosis* antigen." *Mol Immunol* 45: 2499-507.
- Lee, H. C. and S. F. Ziegler (2007). "Inducible expression of the proallergic cytokine thymic stromal lymphopoietin in airway epithelial cells is controlled by NFkappaB." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 914-9.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart and J. A. Hoffmann (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults." *Cell* 86: 973-83.
- Li, J., K. N. Tomkinson, X. Y. Tan, P. Wu, G. Yan, V. Spaulding, B. Deng, B. Annis-Freeman, K. Heveron, R. Zollner, G. De Zutter, J. F. Wright, T. K. Crawford, W. Liu, K. A. Jacobs, N. M. Wolfman, V. Ling, D. D. Pittman, G. M. Veldman and L. A. Fouser (2004). "Temporal associations between interleukin 22 and the extracellular domains of IL-22R and IL-10R2." *Int Immunopharmacol* 4: 693-708.
- Liang, S. C., X. Y. Tan, D. P. Luxenberg, R. Karim, K. Dunussi-Joannopoulos, M. Collins and L. A. Fouser (2006). "Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides." *J Exp Med* 203: 2271-9.
- Liaudet, L., K. G. Murthy, J. G. Mabley, P. Pachter, F. G. Soriano, A. L. Salzman and C. Szabo (2002). "Comparison of inflammation, organ damage, and oxidant stress *Salmonella enterica* serovar *Muenchen* flagellin and serovar lipopolysaccharide." *Infect. Immun.* 70: 192-8.
- Lightfield, K. L., J. Persson, S. W. Brubaker, C. E. Witte, J. von Moltke, E. A. Dunipace, T. Henry, Y. H. Sun, D. Cado, W. F. Dietrich, D. M. Monack, R. M. Tsois and R. E. Vance (2008). "Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin." *Nat Immunol* 9: 1171-8.
- Lillehoj, E. P., B. T. Kim and K. C. Kim (2002). "Identification of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin as an adhesin for Muc1 mucin." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L751-6.

- Lockhart, E., A. M. Green and J. L. Flynn (2006). "IL-17 production is dominated by gamma delta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection." *J Immunol* 177: 4662-9.
- Logsdon, N. J., B. C. Jones, J. C. Allman, L. Izotova, B. Schwartz, S. Pestka and M. R. Walter (2004). "The IL-10R2 binding hot spot on IL-22 is located on the N-terminal helix and is dependent on N-linked glycosylation." *J Mol Biol* 342: 503-14.
- Lorenz, E., J. P. Mira, K. L. Cornish, N. C. Arbour and D. A. Schwartz (2000). "A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection." *Infect Immun* 68: 6398-401.
- Ma, H. L., S. Liang, J. Li, L. Napierata, T. Brown, S. Benoit, M. Senices, D. Gill, K. Dunussi-Joannopoulos, M. Collins, C. Nickerson-Nutter, L. A. Fouser and D. A. Young (2008). "IL-22 is required for Th17 cell-mediated pathology in a mouse model of psoriasis-like skin inflammation." *J Clin Invest* 118: 597-607.
- Macnab, R. M. (2003). "How bacteria assemble flagella." *Annu Rev Microbiol* 57: 77-100.
- Mata-Haro, V., C. Cekic, M. Martin, P. M. Chilton, C. R. Casella and T. C. Mitchell (2007). "The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4." *Science* 316: 1628-32.
- Matsushita, K., O. Takeuchi, D. M. Standley, Y. Kumagai, T. Kawagoe, T. Miyake, T. Satoh, H. Kato, T. Tsujimura, H. Nakamura and S. Akira (2009). "Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay." *Nature* 458: 1185-90.
- Mayer, A. K., M. Muehmer, J. Mages, K. Gueinzus, C. Hess, K. Heeg, R. Bals, R. Lang and A. H. Dalpke (2007). "Differential recognition of TLR-dependent microbial ligands in human bronchial epithelial cells." *J Immunol* 178: 3134-42.
- McCormick, B. A., S. P. Colgan, C. Delp-Archer, S. I. Miller and J. L. Madara (1993). "Salmonella typhimurium attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signalling to subepithelial neutrophils." *J. Cell Biol.* 123: 895-907.
- McDermott, P. F., F. Ciacchi-Woolwine, J. A. Snipes and S. B. Mizel (2000). "High-affinity interaction between gram-negative flagellin and a cell surface polypeptide results in human monocyte activation." *Infect Immun* 68: 5525-9.
- McDonald, W. F., J. W. Huleatt, H. G. Foellmer, D. Hewitt, J. Tang, P. Desai, A. Price, A. Jacobs, V. N. Takahashi, Y. Huang, V. Nakaar, L. Alexopoulou, E. Fikrig and T. J. Powell (2007). "A West Nile virus recombinant protein vaccine that coactivates innate and adaptive immunity." *J Infect Dis* 195: 1607-17.
- McSorley, S. J., B. D. Ehst, Y. Yu and A. T. Gewirtz (2002). "Bacterial flagellin is an effective adjuvant for CD4(+) T cells *in vivo*." *J Immunol* 169: 3914-9.
- Means, T. K., F. Hayashi, K. D. Smith, A. Aderem and A. D. Luster (2003). "The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells." *J Immunol* 170: 5165-75.
- Medzhitov, R. and T. Horng (2009). "Transcriptional control of the inflammatory response." *Nat Rev Immunol* 9: 692-703.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt and C. A. Janeway, Jr. (1997). "A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity." *Nature* 388: 394-7.
- Miao, E. A., D. P. Mao, N. Yudkovsky, R. Bonneau, C. G. Lorang, S. E. Warren, I. A. Leaf and A. Aderem (2010). "Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 3076-80.
- Michel, M. L., A. C. Keller, C. Paget, M. Fujio, F. Trottein, P. B. Savage, C. H. Wong, E. Schneider, M. Dy and M. C. Leite-de-Moraes (2007). "Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia." *J Exp Med* 204: 995-1001.
- Mizel, S. B., A. P. West and R. R. Hantgan (2003). "Identification of a sequence in human toll-like receptor 5 required for the binding of Gram-negative flagellin." *J Biol Chem* 278: 23624-9.
- Mizgerd, J. P. (2006). "Lung infection--a public health priority." *PLoS Med* 3: e76.
- Moors, M. A., L. Li and S. B. Mizel (2001). "Activation of interleukin-1 receptor-associated kinase by gram-negative flagellin." *Infection & Immunity* 69: 4424-9.
- Morisato, D. and K. V. Anderson (1995). "Signaling pathways that establish the dorsal-ventral pattern of the Drosophila embryo." *Annu Rev Genet* 29: 371-99.
- Morris, A. E., H. D. Liggitt, T. R. Hawn and S. J. Skerrett (2009). "Role of Toll-like receptor 5 in the innate immune response to acute P. aeruginosa pneumonia." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297: L1112-9.
- Nakagawa, R., T. Naka, H. Tsutsui, M. Fujimoto, A. Kimura, T. Abe, E. Seki, S. Sato, O. Takeuchi, K. Takeda, S. Akira, K. Yamanishi, I. Kawase, K. Nakanishi and T. Kishimoto (2002). "SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses." *Immunity* 17: 677-87.
- 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: 769-76.
- Neill, D. R., S. H. Wong, A. Bellosi, R. J. Flynn, M. Daly, T. K. Langford, C. Bucks, C. M. Kane, P. G. Fallon, R. Pannell, H. E. Jolin and A. N. McKenzie (2010). "Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity." *Nature* 464: 1367-70.
- Nemont, C., D. Cayet, M. Rumbo, C. Bompard, V. Villeret and J. C. Sirard (2008). "Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity." *J Immunol* 181: 2036-43.
- Nenci, A., C. Becker, A. Wullaert, R. Gareus, G. van Loo, S. Danese, M. Huth, A. Nikolaev, C. Neufert, B. Madison, D. Gumucio, M. F. Neurath and M. Pasparakis (2007). "Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation." *Nature* 446: 557-61.
- Niedergang, F., A. Didierlaurent, J. P. Kraehenbuhl and J. C. Sirard (2004). "Dendritic cells: the host Achilles' heel for mucosal pathogens?" *Trends Microbiol.* 12: 79-88.

- Niess, J. H., S. Brand, X. Gu, L. Landsman, S. Jung, B. A. McCormick, J. M. Vyas, M. Boes, H. L. Ploegh, J. G. Fox, D. R. Littman and H. C. Reinecker (2005). "CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance." *Science* 307: 254-8.
- Nolte, M. A., S. Leibundgut-Landmann, O. Joffre and C. Reis e Sousa (2007). "Dendritic cell quiescence during systemic inflammation driven by LPS stimulation of radioresistant cells in vivo." *J Exp Med* 204: 1487-501.
- Noulin, N., V. F. Quesniaux, S. Schnyder-Candrian, B. Schnyder, I. Maillet, T. Robert, B. B. Vargaftig, B. Ryffel and I. Couillin (2005). "Both hemopoietic and resident cells are required for MyD88-dependent pulmonary inflammatory response to inhaled endotoxin." *J Immunol* 175: 6861-9.
- O'Brien, A. D. and D. L. Rosenstreich (1983). "Genetic control of the susceptibility of C3HeB/FeJ mice to *Salmonella typhimurium* is regulated by a locus distinct from known salmonella response genes." *J Immunol* 131: 2613-5.
- O'Neill, L. A. and A. G. Bowie (2007). "The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling." *Nat Rev Immunol* 7: 353-64.
- O'Quinn, D. B., M. T. Palmer, Y. K. Lee and C. T. Weaver (2008). "Emergence of the Th17 pathway and its role in host defense." *Adv Immunol* 99: 115-63.
- Ogushi, K., A. Wada, T. Niidome, T. Okuda, R. Llanes, M. Nakayama, Y. Nishi, H. Kurazono, K. D. Smith, A. Aderem, J. Moss and T. Hirayama (2004). "Gangliosides act as co-receptors for *Salmonella enteritidis* FliC and promote FliC induction of human beta-defensin-2 expression in Caco-2 cells." *J Biol Chem* 279: 12213-9.
- Onishi, R. M. and S. L. Gaffen (2010). "Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease." *Immunology* 129: 311-21.
- Ortega-Cava, C. F., S. Ishihara, M. A. Rumi, M. M. Aziz, H. Kazumori, T. Yuki, Y. Mishima, I. Moriyama, C. Kadota, N. Oshima, Y. Amano, Y. Kadowaki, N. Ishimura and Y. Kinoshita (2006). "Epithelial toll-like receptor 5 is constitutively localized in the mouse cecum and exhibits distinctive down-regulation during experimental colitis." *Clin Vaccine Immunol* 13: 132-8.
- Oshima, N., S. Ishihara, M. A. Rumi, M. M. Aziz, Y. Mishima, C. Kadota, I. Moriyama, N. Ishimura, Y. Amano and Y. Kinoshita (2010). "A20 is an early responding negative regulator of Toll-like receptor 5 signalling in intestinal epithelial cells during inflammation." *Clin Exp Immunol* 159: 185-98.
- Osterholzer, J. J., T. Ames, T. Polak, J. Sonstein, B. B. Moore, S. W. Chensue, G. B. Toews and J. L. Curtis (2005). "CCR2 and CCR6, but not endothelial selectins, mediate the accumulation of immature dendritic cells within the lungs of mice in response to particulate antigen." *J Immunol* 175: 874-83.
- Ottmann, K. M. and A. C. Lowenthal (2002). "Helicobacter pylori uses motility for initial colonization and to attain robust infection." *Infect Immun* 70: 1984-90.
- Palm, N. W. and R. Medzhitov (2009). "Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity." *Immunol Rev* 227: 221-33.
- Pandey, S. and D. K. Agrawal (2006). "Immunobiology of Toll-like receptors: emerging trends." *Immunol Cell Biol* 84: 333-41.
- Pasare, C. and R. Medzhitov (2003). "Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells." *Science* 299: 1033-6.
- Pasparakis, M. (2009). "Regulation of tissue homeostasis by NF-kappaB signalling: implications for inflammatory diseases." *Nat Rev Immunol* 9: 778-88.
- Passlick, B., D. Flieger and H. W. Ziegler-Heitbrock (1989). "Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood." *Blood* 74: 2527-34.
- Paterson, G. K. and T. J. Mitchell (2006). "Innate immunity and the pneumococcus." *Microbiology* 152: 285-93.
- Pepper, M., J. L. Linehan, A. J. Pagan, T. Zell, T. Dileepan, P. P. Cleary and M. K. Jenkins (2010). "Different routes of bacterial infection induce long-lived TH1 memory cells and short-lived TH17 cells." *Nat Immunol* 11: 83-9.
- Perez-Canadillas, J. M., A. Zaballos, J. Gutierrez, R. Varona, F. Roncal, J. P. Albar, G. Marquez and M. Bruix (2001). "NMR solution structure of murine CCL20/MIP-3alpha, a chemokine that specifically chemoattracts immature dendritic cells and lymphocytes through its highly specific interaction with the beta-chemokine receptor CCR6." *J. Biol. Chem.* 276: 28372-9.
- Phadke, A. P., G. Akangire, S. J. Park, S. A. Lira and B. Mehrad (2007). "The role of CC chemokine receptor 6 in host defense in a model of invasive pulmonary aspergillosis." *Am J Respir Crit Care Med* 175: 1165-72.
- Pichavant, M., S. Taront, P. Jeannin, L. Breuilh, A. S. Charbonnier, C. Spriet, C. Fourneau, N. Corvaia, L. Heliot, A. Brichet, A. B. Tonnel, Y. Delneste and P. Gosset (2006). "Impact of bronchial epithelium on dendritic cell migration and function: modulation by the bacterial motif KpOmpA." *J Immunol* 177: 5912-9.
- Pickert, G., C. Neufert, M. Leppkes, Y. Zheng, N. Wittkopf, M. Warntjen, H. A. Lehr, S. Hirth, B. Weigmann, S. Wirtz, W. Ouyang, M. F. Neurath and C. Becker (2009). "STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing." *J Exp Med* 206: 1465-72.
- Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton and B. Beutler (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." *Science* 282: 2085-8.
- Rakoff-Nahoum, S., J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh, S. Edberg and R. Medzhitov (2004). "Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis." *Cell* 118: 229-41.
- Ramos, H. C., M. Rumbo and J. C. Sirard (2004). "Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa." *Trends Microbiol* 12: 509-17.
- Raoult, E., V. Balloy, I. Garcia-Verdugo, L. Touqui, R. Ramphal and M. Chignard (2009). "Pseudomonas aeruginosa LPS or flagellin are sufficient to activate TLR-dependent signaling in murine alveolar macrophages and airway epithelial cells." *PLoS One* 4: e7259.

- 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: 7548-55.
- Reed, K. A., M. E. Hobert, C. E. Kolenda, K. A. Sands, M. Rathman, M. O'Connor, S. Lyons, A. T. Gewirtz, P. J. Sansonetti and J. L. Madara (2002). "The Salmonella typhimurium flagellar basal body protein FlhE is required for flagellin production and to induce a proinflammatory response in epithelial cells." *J Biol Chem* 277: 13346-53.
- Rescigno, M., M. Urbano, B. Valzasina, M. Francolini, G. Rotta, R. Bonasio, F. Granucci, J. P. Kraehenbuhl and P. Ricciardi-Castagnoli (2001). "Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria." *Nat. Immunol.* 2: 361-7.
- Rhee, S. H., E. Im, M. Riegler, E. Kokkotou, M. O'Brien and C. Pothoulakis (2005). "Pathophysiological role of Toll-like receptor 5 engagement by bacterial flagellin in colonic inflammation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 13610-5.
- Roach, J. C., G. Glusman, L. Rowen, A. Kaur, M. K. Purcell, K. D. Smith, L. E. Hood and A. Aderem (2005). "The evolution of vertebrate Toll-like receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 9577-82.
- Rumbo, M., C. Nempont, J. P. Kraehenbuhl and J. C. Sirard (2006). "Mucosal interplay among commensal and pathogenic bacteria: lessons from flagellin and Toll-like receptor 5." *FEBS Lett* 580: 2976-84.
- Rumbo, M., F. Sierro, N. Debar, J. P. Kraehenbuhl and D. Finke (2004). "Lymphotoxin beta receptor signaling induces the chemokine CCL20 in intestinal epithelium." *Gastroenterology* 127: 213-23.
- Saenz, S. A., M. C. Siracusa, J. G. Perrigoue, S. P. Spencer, J. F. Urban, Jr., J. E. Tocker, A. L. Budelsky, M. A. Kleinschek, R. A. Kastelein, T. Kambayashi, A. Bhandoola and D. Artis (2010). "IL25 elicits a multipotent progenitor cell population that promotes T(H)2 cytokine responses." *Nature* 464: 1362-6.
- Saijo, S., S. Ikeda, K. Yamabe, S. Kakuta, H. Ishigame, A. Aikitsu, N. Fujikado, T. Kusaka, S. Kubo, S. H. Chung, R. Komatsu, N. Miura, Y. Adachi, N. Ohno, K. Shibuya, N. Yamamoto, K. Kawakami, S. Yamasaki, T. Saito, S. Akira and Y. Iwakura (2010). "Dectin-2 recognition of alpha-mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against Candida albicans." *Immunity* 32: 681-91.
- Saitoh, T., N. Fujita, M. H. Jang, S. Uematsu, B. G. Yang, T. Satoh, H. Omori, T. Noda, N. Yamamoto, M. Komatsu, K. Tanaka, T. Kawai, T. Tsujimura, O. Takeuchi, T. Yoshimori and S. Akira (2008). "Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production." *Nature* 456: 264-8.
- Salazar-Gonzalez, R. M., J. H. Niess, D. J. Zambit, R. Ravindran, A. Srinivasan, J. R. Maxwell, T. Stoklasek, R. Yadav, I. R. Williams, X. Gu, B. A. McCormick, M. A. Pazos, A. T. Vella, L. Lefrancois, H. C. Reinecker and S. J. McSorley (2006). "CCR6-mediated dendritic cell activation of pathogen-specific T cells in Peyer's patches." *Immunity* 24: 623-32.
- Salman, H. H., J. M. Irache and C. Gamazo (2009). "Immunoadjuvant capacity of flagellin and mannosamine-coated poly(anhydride) nanoparticles in oral vaccination." *Vaccine* 27: 4784-90.
- Samatey, F. A., K. Imada, S. Nagashima, F. Vonderviszt, T. Kumasaka, M. Yamamoto and K. Namba (2001). "Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling." *Nature* 410: 331-7.
- Sato, A. and A. Iwasaki (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.
- Satoh-Takayama, N., C. A. Vosshenrich, S. Lesjean-Pottier, S. Sawa, M. Lochner, F. Rattis, J. J. Mention, K. Thiam, N. Cerf-Bensussan, O. Mandelboim, G. Eberl and J. P. Di Santo (2008). "Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense." *Immunity* 29: 958-70.
- Schnare, M., G. M. Barton, A. C. Holt, K. Takeda, S. Akira and R. Medzhitov (2001). "Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses." *Nat Immunol* 2: 947-50.
- Schuller, S., M. Lucas, J. B. Kaper, J. A. Giron and A. D. Phillips (2009). "The ex vivo response of human intestinal mucosa to enteropathogenic Escherichia coli infection." *Cell Microbiol* 11: 521-30.
- Schutysse, E., S. Struyf and J. Van Damme (2003). "The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6." *Cytokine Growth Factor Rev* 14: 409-26.
- Seki, M., S. Kohno, M. W. Newstead, X. Zeng, U. Bhan, N. W. Lukacs, S. L. Kunkel and T. J. Standiford (2010). "Critical role of IL-1 receptor-associated kinase-M in regulating chemokine-dependent deleterious inflammation in murine influenza pneumonia." *J Immunol* 184: 1410-8.
- Sellge, G., J. G. Magalhaes, C. Konradt, J. H. Fritz, W. Salgado-Pabon, G. Eberl, A. Bandeira, J. P. Di Santo, P. J. Sansonetti and A. Phalipon (2010). "Th17 cells are the dominant T cell subtype primed by Shigella flexneri mediating protective immunity." *J Immunol* 184: 2076-85.
- Serbina, N. V., T. Jia, T. M. Hohl and E. G. Pamer (2008). "Monocyte-mediated defense against microbial pathogens." *Annu Rev Immunol* 26: 421-52.
- Shang, L., M. Fukata, N. Thirunarayanan, A. P. Martin, P. Arnaboldi, D. Maussang, C. Berin, J. C. Unkeless, L. Mayer, M. T. Abreu and S. A. Lira (2008). "Toll-like receptor signaling in small intestinal epithelium promotes B-cell recruitment and IgA production in lamina propria." *Gastroenterology* 135: 529-38.
- Shaykhiyev, R., J. Behr and R. Bals (2008). "Microbial patterns signaling via Toll-like receptors 2 and 5 contribute to epithelial repair, growth and survival." *PLoS ONE* 3: e1393.
- Sheedy, F. J., E. Palsson-McDermott, E. J. Hennessy, C. Martin, J. J. O'Leary, Q. Ruan, D. S. Johnson, Y. Chen and L. A. O'Neill (2010). "Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21." *Nat Immunol* 11: 141-7.
- Sierro, F., B. Dubois, A. Coste, D. Kaiserlian, J. P. Kraehenbuhl and J. C. Sirard (2001). "Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13722-7.

- Sirard, J. C., A. Didierlaurent, D. Cayet, F. Sierro and M. Rumbo (2009). "Toll-like receptor 5- and lymphotoxin beta receptor-dependent epithelial Ccl20 expression involves the same Nf-kappaB binding site but distinct Nf-kappaB pathways and dynamics." *Biochim Biophys Acta*.
- Sitaraman, S. V., D. Merlin, L. Wang, M. Wong, A. T. Gewirtz, M. Si-Tahar and J. L. Madara (2001). "Neutrophil-epithelial crosstalk at the intestinal luminal surface mediated by reciprocal secretion of adenosine and IL-6." *J Clin Invest* 107: 861-9.
- Slack, J. L., K. Schooley, T. P. Bonnert, J. L. Mitcham, E. E. Qwarnstrom, J. E. Sims and S. K. Dower (2000). "Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways." *J Biol Chem* 275: 4670-8.
- Smith, K. D., E. Andersen-Nissen, F. Hayashi, K. Strobe, M. A. Bergman, S. L. Barrett, B. T. Cookson and A. Aderem (2003). "Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility." *Nat Immunol* 4: 1247-53.
- Sonnenberg, G. F., M. G. Nair, T. J. Kirn, C. Zaph, L. A. Fouser and D. Artis (2010). "Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A." *J Exp Med* 207: 1293-305.
- Sperandio, B., B. Regnault, J. Guo, Z. Zhang, S. L. Stanley, Jr., P. J. Sansonetti and T. Pedron (2008). "Virulent *Shigella flexneri* subverts the host innate immune response through manipulation of antimicrobial peptide gene expression." *J Exp Med* 205: 1121-32.
- Sporri, R. and C. Reis e Sousa (2005). "Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function." *Nat Immunol* 6: 163-70.
- Steiner, T. S., J. P. Nataro, C. E. Poteet-Smith, J. A. Smith and R. L. Guerrant (2000). "Enteropathogenic *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells." *J Clin Invest* 105: 1769-77.
- Sutton, C. E., S. J. Lalor, C. M. Sweeney, C. F. Brereton, E. C. Lavelle and K. H. Mills (2009). "Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity." *Immunity* 31: 331-41.
- Takeuchi, O. and S. Akira (2010). "Pattern recognition receptors and inflammation." *Cell* 140: 805-20.
- Territo, M. C., T. Ganz, M. E. Selsted and R. Lehrer (1989). "Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils." *J Clin Invest* 84: 2017-20.
- Thieblemont, N., L. Weiss, H. M. Sadeghi, C. Estcourt and N. Haeflner-Cavaillon (1995). "CD14^{low}CD16^{high}: a cytokine-producing monocyte subset which expands during human immunodeficiency virus infection." *Eur J Immunol* 25: 3418-24.
- Tsutsui, S., O. Nakamura and T. Watanabe (2007). "Lamprey (*Lethenteron japonicum*) IL-17 upregulated by LPS-stimulation in the skin cells." *Immunogenetics* 59: 873-82.
- Turer, E. E., R. M. Tavares, E. Mortier, O. Hitotsumatsu, R. Advincula, B. Lee, N. Shifrin, B. A. Malynn and A. Ma (2008). "Homeostatic MyD88-dependent signals cause lethal inflammation in the absence of A20." *J Exp Med* 205: 451-64.
- Uematsu, S., K. Fujimoto, M. H. Jang, B. G. Yang, Y. J. Jung, M. Nishiyama, S. Sato, T. Tsujimura, M. Yamamoto, Y. Yokota, H. Kiyono, M. Miyasaka, K. J. Ishii and S. Akira (2008). "Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5." *Nat Immunol* 9: 769-76.
- Uematsu, S., M. H. Jang, N. Chevrier, Z. Guo, Y. Kumagai, M. Yamamoto, H. Kato, N. Sougawa, H. Matsui, H. Kuwata, H. Hemmi, C. Coban, T. Kawai, K. J. Ishii, O. Takeuchi, M. Miyasaka, K. Takeda and S. Akira (2006). "Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c⁺ lamina propria cells." *Nat Immunol* 7: 868-74.
- Uhlir, H. H., B. S. McKenzie, S. Hue, C. Thompson, B. Joyce-Shaikh, R. Stepankova, N. Robinson, S. Buonocore, H. Tlaskalova-Hogenova, D. J. Cua and F. Powrie (2006). "Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology." *Immunity* 25: 309-18.
- Vaishnava, S., C. L. Behrendt, A. S. Ismail, L. Eckmann and L. V. Hooper (2008). "Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 20858-63.
- Vallon-Eberhard, A., L. Landsman, N. Yogev, B. Verrier and S. Jung (2006). "Transepithelial pathogen uptake into the small intestinal lamina propria." *J Immunol* 176: 2465-9.
- van der Poll, T. and S. M. Opal (2009). "Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia." *Lancet* 374: 1543-56.
- Vanbervliet, B., B. Homey, I. Durand, C. Massacrier, S. Ait-Yahia, O. de Bouteiller, A. Vicari and C. Caux (2002). "Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces." *Eur J Immunol* 32: 231-42.
- Vereecke, L., M. Sze, C. M. Guire, B. Rogiers, Y. Chu, M. Schmidt-Supprian, M. Pasparakis, R. Beyaert and G. van Loo (2010). "Enterocyte-specific A20 deficiency sensitizes to tumor necrosis factor-induced toxicity and experimental colitis." *J Exp Med* 207: 1513-23.
- Vijay-Kumar, M., C. J. Sanders, R. T. Taylor, A. Kumar, J. D. Aitken, S. V. Sitaraman, A. S. Neish, S. Uematsu, S. Akira, I. R. Williams and A. T. Gewirtz (2007). "Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice." *J Clin Invest* 117: 3909-21.
- von Bernuth, H., C. Picard, Z. Jin, R. Pankla, H. Xiao, C. L. Ku, M. Chrabieh, I. B. Mustapha, P. Ghandil, Y. Camcioglu, J. Vasconcelos, N. Sirvent, M. Guedes, A. B. Vitor, M. J. Herrero-Mata, J. I. Arostegui, C. Rodrigo, L. Alsina, E. Ruiz-Ortiz, M. Juan, C. Fortuny, J. Yague, J. Anton, M. Pascal, H. H. Chang, L. Janniere, Y. Rose, B. Z. Garty, H. Chapel, A. Issekutz, L. Marodi, C. Rodriguez-Gallego, J. Banchereau, L. Abel, X. Li, D. Chaussabel, A. Puel and J. L. Casanova (2008). "Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency." *Science* 321: 691-6.
- Wald, D., J. Qin, Z. Zhao, Y. Qian, M. Naramura, L. Tian, J. Towne, J. E. Sims, G. R. Stark and X. Li (2003). "SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling." *Nat Immunol* 4: 920-7.

- Wang, C., S. G. Kang, H. HogenEsch, P. E. Love and C. H. Kim (2010). "Retinoic acid determines the precise tissue tropism of inflammatory Th17 cells in the intestine." *J Immunol* 184: 5519-26.
- Wang, T., T. Town, L. Alexopoulou, J. F. Anderson, E. Fikrig and R. A. Flavell (2004). "Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis." *Nat Med* 10: 1366-73.
- Weber, C., K. U. Belge, P. von Hundelshausen, G. Draude, B. Steppich, M. Mack, M. Frankenberger, K. S. Weber and H. W. Ziegler-Heitbrock (2000). "Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations." *J Leukoc Biol* 67: 699-704.
- Weimer, E. T., S. E. Ervin, D. J. Wozniak and S. B. Mizel (2009). "Immunization of young African green monkeys with OprF epitope 8-OprI-type A- and B-flagellin fusion proteins promotes the production of protective antibodies against nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*." *Vaccine* 27: 6762-9.
- Winter, C., K. Taut, M. Srivastava, F. Langer, M. Mack, D. E. Briles, J. C. Paton, R. Maus, T. Welte, M. D. Gunn and U. A. Maus (2007). "Lung-specific overexpression of CC chemokine ligand (CCL) 2 enhances the host defense to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice: role of the CCL2-CCR2 axis." *J Immunol* 178: 5828-38.
- Wolk, K., H. S. Haugen, W. Xu, E. Witte, K. Waggie, M. Anderson, E. Vom Baur, K. Witte, K. Warszawska, S. Philipp, C. Johnson-Leger, H. D. Volk, W. Sterry and R. Sabat (2009). "IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN-gamma are not." *J Mol Med* 87: 523-36.
- Wolk, K., S. Kunz, E. Witte, M. Friedrich, K. Asadullah and R. Sabat (2004). "IL-22 increases the innate immunity of tissues." *Immunity* 21: 241-54.
- Wolk, K., E. Witte, E. Wallace, W. D. Docke, S. Kunz, K. Asadullah, H. D. Volk, W. Sterry and R. Sabat (2006). "IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis." *Eur J Immunol* 36: 1309-23.
- Wolk, K., E. Witte, K. Witte, K. Warszawska and R. Sabat (2010). "Biology of interleukin-22." *Semin Immunopathol* 32: 17-31.
- Woods, J. P., J. A. Frelinger, G. Warrack and J. G. Cannon (1988). "Mouse genetic locus Lps influences susceptibility to *Neisseria meningitidis* infection." *Infect Immun* 56: 1950-5.
- Wozniak, T. M., B. M. Saunders, A. A. Ryan and W. J. Britton (2010). "BCG-specific Th17 cells confer partial protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in the absence of IFN- γ ." *Infect Immun*.
- Wright, J. F., Y. Guo, A. Quazi, D. P. Luxenberg, F. Bennett, J. F. Ross, Y. Qiu, M. J. Whitters, K. N. Tomkinson, K. Dunussi-Joannopoulos, B. M. Carreno, M. Collins and N. M. Wolfman (2007). "Identification of an interleukin 17F/17A heterodimer in activated human CD4⁺ T cells." *J Biol Chem* 282: 13447-55.
- Wyant, T. L., M. K. Tanner and M. B. Szein (1999). "Salmonella typhi flagella are potent inducers of proinflammatory cytokine secretion by human monocytes." *Infect Immun* 67: 3619-24.
- Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, H. Sanjo, S. Uematsu, T. Kaisho, K. Hoshino, O. Takeuchi, M. Kobayashi, T. Fujita, K. Takeda and S. Akira (2002). "Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4." *Nature* 420: 324-9.
- Yamamoto, M., S. Yamazaki, S. Uematsu, S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Kuwata, O. Takeuchi, K. Takeshige, T. Saitoh, S. Yamaoka, N. Yamamoto, S. Yamamoto, T. Muta, K. Takeda and S. Akira (2004). "Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein I κ B ζ ." *Nature* 430: 218-22.
- Yang, D., Q. Chen, D. M. Hoover, P. Staley, K. D. Tucker, J. Lubkowski and J. J. Oppenheim (2003). "Many chemokines including CCL20/MIP-3 α display antimicrobial activity." *J Leukoc Biol* 74: 448-55.
- Yang, D., O. Chertov, S. N. Bykovskaia, Q. Chen, M. J. Buffo, J. Shogan, M. Anderson, J. M. Schroder, J. M. Wang, O. M. Howard and J. J. Oppenheim (1999). "Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6." *Science* 286: 525-8.
- Ye, P., F. H. Rodriguez, S. Kanaly, K. L. Stocking, J. Schurr, P. Schwarzenberger, P. Oliver, W. Huang, P. Zhang, J. Zhang, J. E. Shellito, G. J. Bagby, S. Nelson, K. Charrier, J. J. Peschon and J. K. Kolls (2001). "Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense." *J Exp Med* 194: 519-27.
- Yonekura, K., S. Maki-Yonekura and K. Namba (2003). "Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy." *Nature* 424: 643-50.
- Young, G. M., D. H. Schmiel and V. L. Miller (1999). "A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6456-61.
- Yu, F. S., M. D. Cornicelli, M. A. Kovach, M. W. Newstead, X. Zeng, A. Kumar, N. Gao, S. G. Yoon, R. L. Gallo and T. J. Standiford (2010). "Flagellin stimulates protective lung mucosal immunity: role of cathelicidin-related antimicrobial peptide." *J Immunol* 185: 1142-9.
- Zaslloff, M. (2002). "Antimicrobial peptides of multicellular organisms." *Nature* 415: 389-95.
- Zenewicz, L. A., G. D. Yancopoulos, D. M. Valenzuela, A. J. Murphy, M. Karow and R. A. Flavell (2007). "Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation." *Immunity* 27: 647-59.
- Zenewicz, L. A., G. D. Yancopoulos, D. M. Valenzuela, A. J. Murphy, S. Stevens and R. A. Flavell (2008). "Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease." *Immunity* 29: 947-57.
- Zeng, H., A. Q. Carlson, Y. Guo, Y. Yu, L. S. Collier-Hyams, J. L. Madara, A. T. Gewirtz and A. S. Neish (2003). "Flagellin is the major proinflammatory determinant of enteropathogenic *Salmonella*." *J Immunol* 171: 3668-74.
- Zhang, D., G. Zhang, M. S. Hayden, M. B. Greenblatt, C. Bussey, R. A. Flavell and S. Ghosh (2004). "A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria." *Science* 303: 1522-6.
- Zheng, Y., F. Niyonsaba, H. Ushio, S. Ikeda, I. Nagaoka, K. Okumura and H. Ogawa (2008a). "Microbicidal protein psoriasin is a multifunctional modulator of neutrophil activation." *Immunology* 124: 357-67.

- Zheng, Y., P. A. Valdez, D. M. Danilenko, Y. Hu, S. M. Sa, Q. Gong, A. R. Abbas, Z. Modrusan, N. Ghilardi, F. J. de Sauvage and W. Ouyang (2008b). "Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens." **Nat Med** 14: 282-9.
- Zhou, X., J. A. Giron, A. G. Torres, J. A. Crawford, E. Negrete, S. N. Vogel and J. B. Kaper (2003). "Flagellin of enteropathogenic *Escherichia coli* stimulates interleukin-8 production in T84 cells." **Infect Immun** 71: 2120-9.
- Zygmunt, B. M., F. Rharbaoui, L. Groebe and C. A. Guzman (2009). "Intranasal immunization promotes th17 immune responses." **J Immunol** 183: 6933-8.