

ANNEE 2007

THESE

Présentée en vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE REIMS
CHAMPAGNE ARDENNE

Discipline : Immunologie

Par

Thomas BARANEK

Né le 16 Mars 1979 à Chatillons-Sur-Seine (21)

Régulation des monocytes et des cellules
dendritiques par les produits de dégradation
de l'élastine chez l'Homme

JURY

Rapporteurs	Dr. Mary OSBORNE-PELLEGRIN (Paris) Pr. Jacques PIETTE (Liège)
Examineurs	Pr. Moncef GUENOUNOU (Reims) Dr. Frank ANTONICELLI (Reims) Dr. Joël PESTEL (Lille)
Directeur de thèse	<u>Dr. Richard LE NAOUR</u> (Reims)

Remerciements

Je tiens à remercier le Professeur *Moncef Guenounou* pour m'avoir permis de réaliser ces travaux au sein du laboratoire d'Immuno-Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire (EA 3796). Merci de m'avoir accordé votre confiance.

Un immense merci au Docteur *Richard Le Naour*, mon directeur de thèse, pour m'avoir proposé de travailler sur ce projet de recherche et de m'avoir accordé sa confiance afin de le mener à bien. Je le remercie pour la qualité de son encadrement, sa rigueur et la pertinence de ses remarques. Je le remercie également pour sa disponibilité quotidienne et pour son degré d'implication dans ces travaux, notamment lors des moments les plus importants. Merci aussi pour m'avoir initié à la cytométrie en flux. Merci, enfin, de m'avoir fait partager tes qualités d'enseignant au cours de mon monitorat d'initiation à l'enseignement.

Je remercie Madame le Docteur *Mary Osborne-Pellegrin*, Chargée de recherche à l'INSERM U698 à Paris, et Monsieur le Professeur *Jacques Piette*, Directeur du GIGA-Research de l'Université de Liège, de me faire l'honneur d'être rapporteurs de ce travail de thèse.

Je remercie vivement le Docteur *Frank Antonicelli*, Maître de conférences, pour sa participation importante à ce travail, sa disponibilité et ses précieux conseils. Merci également d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie Monsieur *Joël Pestel*, Directeur de recherche CNRS d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie le Professeur *Philippe Nguyen* pour avoir mis à ma disposition les moyens du service d'hématologie de l'hôpital de Reims pour la technique d'élutriation à contre-courant qui est à la base de l'ensemble des résultats obtenus au cours de ces travaux.

Je remercie également le Docteur *William Hornebeck* pour ses excellents conseils et pour les corrections des articles.

Merci au Docteur *Bouchaib Lamkhioued* pour sa participation active à ce travail ainsi que d'avoir partagé ses connaissances scientifiques et son expérience de la recherche à l'étranger au travers de nombreuses discussions.

Merci au Professeur *Sophie Gangloff* pour sa gentillesse.

Je remercie le Docteur *Valérie Gafa* pour sa simplicité et les discussions récentes sur les cellules dendritiques.

Merci aussi au Docteur *Romain Debret* pour ses aides techniques et scientifiques en biochimie et en biologie moléculaire.

Je remercie le Docteur *Hervé Kaplan* pour son aide en microscopie confocale.

Merci à *Catherine Macé* d'avoir réalisé les éluutriations chaque semaine tout au long de ces 4 années. Merci pour ta sympathie et ta serviabilité.

Je remercie *Catherine* et *jennifer* pour leur aide « administrative » et surtout pour leur bonne humeur et leur gentillesse ainsi que *Chantal Grimplet* pour sa disponibilité et l'ensemble des services rendus chaque jour.

Merci à *Pascale Koebel* pour ses encouragements incessants, pour sa disponibilité et pour ses connaissances scientifiques et techniques exceptionnelles. Merci pour ta gentillesse jamais mise à défaut et pour ton aide continuelle.

Merci à *Denise*, ma « co-thésarde », pour l'entraide et le soutien mutuel au cours de ces 3 années ainsi que pour les bons et les moins bons moments partagés au labo, et ailleurs... Merci pour la spontanéité et pour les repas libanais.

Merci aux étudiants, passés et présents, de l'EA 3796 : *Ludo, Delphine, Kader, Fred, Sandie, Christelle, Aurélie* et notamment *Hassan* pour son aide lors de la correction du manuscrit et sa bonne humeur.

Merci surtout à tous mes amis, particulièrement aux « *Dijonnais* » et aux « *Rémois* ». Clin d'œil à *Laurent, Oliv et Jonat*. Merci à tous pour tout et notamment de ne pas (ou plus !!) faire partie du milieu de la recherche ce qui m'a aidé à relativiser et à traverser les moments difficiles de la thèse.

Merci à l'ensemble de ma famille...

SOMMAIRE

Bibliographie Personnelle.....	-1-
Liste des Abréviations.....	-3-
Liste des illustrations.....	-6-
Contexte scientifique.....	-9-

INTRODUCTION

Chapitre 1 : Elastine et peptides d'élastine.....	-12-
A. Genèse de l'élastine.....	-12-
1. La tropoélastine.....	-12-
2. Le gène de l'élastine.....	-13-
3. Régulation de l'expression du gène de l'élastine.....	-14-
4. Sécrétion de la tropoélastine.....	-15-
5. Incorporation de la tropoélastine dans les fibres élastiques.....	-15-
6. Structure de l'élastine mature.....	-18-
7. Structure des fibres élastiques.....	-19-
8. Dégradation de l'élastine.....	-19-
B. Les peptides d'élastines.....	-20-
1. Origine des peptides d'élastine.....	-20-
2. Peptides d'élastine et activités biologiques	-21-
C. Le complexe récepteur de l'élastine	-23-
1. Structure du complexe récepteur de l'élastine.....	-24-
1.1. L'Elastin Binding Protein (EBP).....	-24-
1.2. La Protéine Protectrice/Cathepsine A (PPCA).....	-26-
1.3. La neuraminidase (Neu-1).....	-26-
2. Transduction du signal intracellulaire.....	-27-
Chapitre 2 : Monocytes et cytokines de l'inflammation.....	-29-
A. Les monocytes.....	-29-
B. Les cytokines de l'inflammation.....	-30-

1. Le facteur de nécrose des tumeurs alpha (TNF- α).....	-30-
1.1. Structure du gène et de la protéine.....	-31-
1.2. Sources et inducteurs.....	-32-
1.3. Activités biologiques.....	-32-
2. L'interleukine-1 α (IL-1 α).....	-33-
2.1. Structure du gène et de la protéine.....	-33-
2.2. Sources et inducteurs.....	-33-
2.3. Activités biologiques.....	-34-
3. L'interleukine-6 (IL-6).....	-34-
3.1. Structure du gène et de la protéine.....	-34-
3.2. Sources et inducteurs.....	-34-
3.3. Activités biologiques.....	-35-
4. L'interkine-10 (IL-10).....	-35-
4.1. Structure du gène et de la protéine.....	-35-
4.2. Sources et inducteurs.....	-36-
4.3. Activités biologiques.....	-36-
5. L'interleukine-12 (IL-12).....	-37-
5.1. Structure du gène et de la protéine.....	-37-
5.2. Source et inducteurs.....	-37-
5.3. Activités biologiques.....	-38-

Chapitre 3 : les cellules dendritiques et la tolérance

immunologique.....	-39-
A. Les Cellules Dendritiques.....	-39-
1. Généralités.....	-39-
2. Ontogenèse des cellules dendritiques.....	-40-
2.1. Les CD myéloïdes (CDm)	-40-
2.2. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (CDp)	-41-
3. Les cellules dendritiques dérivées des monocytes.....	-42-
4. Caractéristiques fonctionnelles des cellules dendritiques.....	-42-
4.1. Capture de l'Antigène.....	-43-
4.2. Maturation des cellules dendritiques et apprêtement de l'Ag.....	-43-
4.3. Migration des cellules dendritiques et réseau des chimiokines	-44-

4.4. Activation des LT par les CD : mise en jeu de la synapse immunologique.....	-45-
B. La Tolérance immunologique.....	-46-
1. Tolérance centrale.....	-46-
2. Tolérance périphérique.....	-47-
2.1. L'anergie clonale.....	-48-
2.2. La délétion clonale.....	-48-
2.3. L'ignorance immunologique.....	-48-
2.4. La déviation immune.....	-48-
2.5. La suppression active : les lymphocytes T régulateurs/suppresseurs.....	-49-
3. Contrôle de la tolérance périphérique par les CD.....	-50-
3.1. Tolérance et maturation des CD.....	-50-
3.2. Induction de la tolérance par des CD tolérogéniques.....	-50-
3.2.1. Absence du signal de co-stimulation.....	-50-
3.2.2. Les récepteurs inhibiteurs.....	-51-
3.2.3. La dégradation du tryptophane.....	-51-
3.2.4. La production de cytokines anti-inflammatoires.....	-52-
4. Les inducteurs de CD tolérogéniques.....	-52-
4.1. Les Antigènes du Soi.....	-52-
4.2. Les molécules immunosuppressives.....	-53-
4.3. Les cellules tumorales.....	-53-

Chapitre 4 : Inflammation et pathologies inflammatoires

chroniques : rôle des peptides d'élastine.....-54-

A. La réaction inflammatoire aiguë.....	-54-
1. Les différentes étapes de la réaction inflammatoire aiguë.....	-55-
1.1. Reconnaissance de l'agent initiateur et déclenchement de la réaction inflammatoire.....	-55-
1.1.1. Les agents initiateurs.....	-55-
1.1.2. Les récepteurs de l'inflammation.....	-55-
1.2. Etape vasculaire de l'inflammation.....	-59-
1.3. Amplification de la réaction.....	-59-
1.4. Elimination de l'agent initiateur et réparation tissulaire.....	-60-

2. Le LPS : agent initiateur de la réaction inflammatoire.....	-61-
2.1. Les principales caractéristiques du LPS.....	-61-
2.2. Rôle du TLR4 dans les effets biologiques du LPS.....	-62-
2.2.1. Reconnaissance et prise en charge du LPS.....	-62-
2.2.2. LPS et voies de signalisation.....	-63-
2.2.2.1. Evénements précoces.....	-63-
2.2.2.2. les IRF dans la signalisation du TLR4.....	-64-
2.2.2.3. la voie des MAPK.....	-65-
a) La voie Erk.....	-66-
b) La voie p38.....	-66-
c) La voie JNK.....	-66-
2.2.2.4. la voie de signalisation IKK/NF- κ B.....	-67-
B. Pathologies Inflammatoires chroniques et peptides d'élastine.....	-69-
1. Pathologies artérielles inflammatoires.....	-69-
2. La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO).....	-70-
2.1. BPCO et élastases.....	-71-
2.2. Influence des peptides d'élastine au cours de la BPCO.....	-71-
3. Le mélanome.....	-72-
But du travail.....	-73-

Matériels et Méthodes

A. Isolement des monocytes et des lymphocytes humains par la technique d'élutriation à contre-courant.....	-74-
1. La technique d'élutriation à contre-courant.....	-74-
1.1.Principe.....	-74-
1.2. Méthodologie.....	-76-
2. Elutriation des lymphocytes et des monocytes humains.....	-76-
3. Elimination des hématies de la fraction lymphocytaire par centrifugation en gradient de densité.....	-77-
B. Analyse de la pureté des populations cellulaires et tri des lymphocytes T CD3 ⁺ CD4 ⁺ par la technique de cytométrie en flux.....	-78-
1. Principe de la cytométrie en flux.....	-78-

2. Analyse de la pureté des monocytes isolés par élutriation à contre-courant..	-80-
2.1. Préparation des cellules.....	-80-
2.2. Analyse des populations cellulaires.....	-80-
3. Tri cellulaire des lymphocytes T CD3 ⁺ CD4 ⁺ par cytométrie en flux.....	-81-
3.1. Préparation des cellules.....	-81-
3.2. Analyse des populations cellulaires.....	-82-
3.3. Principe du tri cellulaire par cytométrie en flux.....	-83-
3.4. Tri des lymphocytes T CD3 ⁺ CD4 ⁺	-84-

Résultats

<u>1^{ère} partie</u> : Rôle des peptides d'élastine dans la régulation de la production de cytokines inflammatoires par les monocytes humains activés par le LPS.....	-85-
--	------

<u>2^{nde} partie</u> : Rôle des peptides d'élastine dans la régulation des fonctions biologiques des cellules dendritiques humaines.....	-125-
---	-------

Discussion générale.....	-161-
--------------------------	-------

Conclusions et Perspectives.....	-171-
----------------------------------	-------

Références bibliographiques.....	-174-
----------------------------------	-------

Bibliographie Personnelle

Publications scientifiques (dans des journaux internationaux à comité de lecture)

Thomas Baranek, William Hornebeck, Moncef Guenounou, and Richard Le Naour. Elastin peptides prevent human dendritic cells maturation and induce generation of tolerogenic dendritic cells. Soumis à *The journal of immunology*.

Vincent Wellemans, Hassan Ait Benhassou, Thomas Baranek, Richard Le Naour, Moncef Guenounou, Sophie Laberge and Bouchaib Lamkhioed. Truncation of Eotaxin Receptor (CCR3) by Matrix Metalloproteinases Affects Chemotaxis and Inhibits Respiratory Syncytial Virus infection. *The journal of immunology*. Sous presse.

D'Onofrio MF, Brézillon S, Baranek T, Perreau C, Roughley PJ, Maquart FX, Wegrowski Y. Identification of beta1 integrin as mediator of melanoma cell adhesion to lumican. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Nov 5.

Thomas Baranek, Romain Debret, Frank Antonicelli, Bouchaib Lamkhioed, Azzaq Belaaouaj, William Hornebeck, Philippe Bernard, Moncef Guenounou, and Richard Le Naour. Elastin receptor (S-gal) occupancy by elastin peptides counteracts pro-inflammatory cytokines expression in LPS-stimulated human monocytes through NF- κ B down-regulation. *The journal of immunology*. 2007 Nov 1; 179(9):6184-6192.

E Dasse, L Bridoux, T Baranek, E Lambert, S Salesse, ML Sowa, L Martiny, C Trentesaux and E Petitfrere. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 promotes hematopoietic differentiation via caspase-3 upstream the MEKK1/MEK6/p38alpha pathway. *Leukemia*. 2007 Apr; 21(4):595-603.

Hajj, R., Baranek, T., Le Naour, R., LeSimple, P., Puchelle, E., Coraux, C. Human adult epithelial basal cells are progenitors of the airway surface epithelium. *Stem Cells*. 2007 Jan; 25(1):139-48.

Communication orale

Baranek T., Antonicelli F., Lamkhioed B., Hornebeck W., Guenounou M. et Le Naour R. Effets des peptides d'élastine sur la régulation de la synthèse de cytokines inflammatoires par les monocytes humains. Cytometry 2006. Brugges. 18 au 20/10/2006.

Communications affichées

Baranek T., Lamkhioued B., Antonicelli F., Hornebeck W, Guenounou M. Le Naour R. The VGVAPG elastin peptide inhibits production of pro-inflammatory cytokines by LPS-activated human monocytes. 1st Joint Meeting of European National Societies of immunology. Paris. 09/09/2006.

Baranek T., Lamkhioued B., Antonicelli F., Hornebeck W, Guenounou M. Le Naour R. Effets des peptides d'élastine sur la régulation de la synthèse de cytokines inflammatoires par les monocytes humains. Journée des jeunes chercheurs, Reims. 13/06/2006.

Baranek T., Lamkhioued B., Hornebeck W., Guenounou M. et Le Naour R. Effets des peptides d'élastine sur la régulation de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes humains. Société de Biologie de Reims, Reims. 19/10/2005. 1^{er} Prix Boehringer-Ingelheim.

Liste des Abréviations

AA	Acide Aminé
AAA	Aneurisme Aortique Abdominal
Ac	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
Ag	Antigène
AMPc	Adénosine 3', 5'-monophosphate cyclique
AP-1/-2	<i>Activator protein-1/ -2</i>
APC	Allophycocyanine
APS	Ammonium persulfate
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BFA	Bréfeldine A
BPCO	Bronchopneumopathie chronique obstructive
BSA	<i>Bovin Serum Albumine</i>
CCR	Récepteurs des Chimiokines
CD	Cellules dendritiques
CD1a	<i>Cluster of differentiation 1a</i>
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CO2	Dioxyde de carbone
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
dNTP	Désoxynucléotide Triphosphate
DO	Densité optique
EBP	<i>Elastin binding protein</i>
EbpS	EBP de <i>Staphylococcus aureus</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGTA	<i>Ethylene glycol-bis(b-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
Erk	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
g	Gramme
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
GMPc	Guanosine 3', 5'-monophosphate cyclique
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GRO	<i>Growth-Regulated Oncogene</i>
GTP	Guanosine 5'-triphosphate
H2O2	Peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée
HEPES	Hydroxyethylpiperazine ethanesulfonate
HRP	<i>Horse Radish Peroxydase</i>
HSP	<i>Heat shock protein</i>
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
iCD :	cellule dendritique immature
IFNá, ã	Interféron-á, -ã
Ig	Immunoglobuline

IGF-1	<i>Insulin-Like Growth Factor</i>
IKK	<i>IêB-Kinase</i>
IL-	Interleukine-
IL-1R	Récepteur de l'Interleukine-1
IL-1Ra	<i>Interleukin-1 Receptor antagonist</i>
IP ₃	Inositol 3, 4, 5-trisphosphate
IêB	Inhibiteur de NF-êB
JAK	<i>Janus Kinase</i>
JNK	<i>c-jun N-terminal kinase</i>
kb	kilobase
KCl	Chlorure de potassium
kDa	kiloDalton
k-E	kappa-élastine
LacCer	<i>Lactosyl Ceramide</i>
LBA	Lavage broncho-alvéolaire
LBP	<i>LPS-binding protein</i>
LC	cellules de Langerhans
LOX	Lysyl Oxydase
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocyte T
LTA	<i>lipoteichoic acid</i>
LRR	<i>Leucine-rich repeat</i>
M	Molaire (mol/L)
MAGP	<i>Microfibrills Associated Glycoprotein</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Kinase</i>
MCP-1	<i>Macrophage chemoattractant protein</i>
MEC	Matrice Extracellulaire
MEK	MAPK/Erk Kinase
MgCl ₂	Chlorure de magnésium
min	Minute
mL	Millilitre
mm	Millimètre
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
Mo-DC	Cellules dendritiques dérivées de monocytes
MT-MMP	<i>Membrane Type-MMP</i>
MyD88	<i>Myeloid Differentiation Factor 88</i>
NaCl	Chlorure de sodium
NEMO	<i>NF- êB Essential Modulator</i>
Neu	Neuraminidase
NF-êB	<i>Nuclear factor- êB</i>
ng	Nanogramme
NK	<i>Natural Killer</i>
PAGE	<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
pb	paire de bases
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS	<i>Phosphate buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PDE	Peptides d'élastine

PE	Phycoerythrine
PFA	Paraformaldehyde
PHA	Phytohemagglutinine A
PI3-K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PKG	Protéine Kinase G
PNN	Polynucléaires neutrophiles
PPCA	Protéine Protectrice/cathepsine A
PRRs	<i>Pattern recognition receptors</i>
PTX	Protéine G sensible à la toxine pertussique
RANTES	<i>Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RER	Réticulum Endoplasmique Rugueux
RT	<i>Reverse Transcription</i>
s	Seconde
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	<i>SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
S-gal	<i>Spliced-galactosidase</i>
SP-1	<i>Specific protein-1</i>
SRE	<i>Serum responsive element</i>
SRF	<i>Serum-Response Factor</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
SVF	Sérum de veau foetal
TBE	Tris-borate EDTA
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TCR	<i>T Cell Receptor</i>
TEMED	Tetraethylmethylenediamine
TGF- α	<i>Transforming Growth Factor- α</i>
Th1, 2	<i>T helper type-1, -2</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitor of MMP</i>
TIR	<i>Toll-interleukin 1 receptor</i>
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
TMB	Tétraméthylbenzidine
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor- α</i>
TRAF6	<i>TNF receptor-associated factor</i>
Treg	LT régulateur
TSP-1	Thrombospondine-1
UV	Ultra violet
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VIP	<i>Vasoactive intestinal polypeptide</i>
vs.	Versus
α -Gal	α -galactosidase
μ g	Microgramme
μ L	Microlitre
μ m	Micromètre
°C	Degré Celsius

Liste des illustrations

INTRODUCTION

Tableau 1 : Séquences d'acides aminés de deux domaines typiques de la tropoélastine

Schéma 1 : Structure de l'ADNc de la tropoélastine humaine

Schéma 2 : Description schématique de la formation des fibres élastiques

Schéma 3 : Structure et formation des liaisons croisées de l'élastine

Schéma 4 : Modèles structuraux proposés pour l'élastine

Schéma 5 : Organisation des fibres élastiques dans l'aorte (A), le poumon (B) et le cartilage de l'oreille (C)

Tableau 2 : Effets biologiques des peptides d'élastines

Schéma 6 : Le complexe récepteur de l'élastine

Schéma 7 : Schématisation de l'épissage alternatif du transcrit primaire de la β -gal.

Schéma 8 : Activation du complexe récepteur de l'élastine

Schéma 9 : Schéma général des voies de signalisation induites par l'activation du complexe récepteur de l'élastine

Schéma 10 : Ontogénie des cellules dendritiques

Schéma 11 : La synapse immunologique

Schéma 12 : Les différents mécanismes de tolérance périphérique

Schéma 13 : Implication de l'IDO dans l'induction de la tolérance

Schéma 14 : Implication de NF- κ B dans la signalisation induite par la stimulation des récepteurs de l'inflammation

Schéma 15 : La migration transendothéliale

Tableau 3 : Les TLR chez les mammifères et leurs ligands

Tableau 4 : Les PPR non-TLR des mammifères et leurs ligands

Schéma 16 : Structure d'un LPS lisse d'entérobactéries

Schéma 17 : Le complexe récepteur TLR4

Schéma 18 : Événements précoces du signal de transduction du TLR4

Schéma 19 : Cascades de signalisation des MAPK

Schéma 20 : Les protéines des familles NF- $\hat{e}$ B et I- $\hat{e}$ B

Schéma 21 : Modèle d'activation de NF- $\hat{e}$ B

MATERIELS ET METHODES

- Schéma 22 : Le système d'élutriation JE-6B (Beckman-Coulter®)
- Schéma 23 : Les trois phases de répartition des cellules au cours de l'élutriation
- Schéma 24 : Isolement des lymphocytes par le LymphoprepTM
- Schéma 25 : Principe de l'analyse cellulaire par un cytomètre en flux
- Schéma 26 : (A) Représentation bi-paramétrique de la taille (FSC) en fonction de la complexité (SSC) des monocytes. (B) Histogramme de l'intensité de fluorescence IP. (C) Histogramme de l'intensité de fluorescence FITC.
- Schéma 27 : Représentation bi-paramétrique de la taille (FSC) en fonction de la complexité (SSC) des cellules de la fraction lymphocytaire d'élutriation
- Schéma 28 : Représentation bi-paramétrique de la taille (FSC) en fonction de la fluorescence de Iodure de propidium (PI) des cellules de la population P1.
- Schéma 29: Représentation bi-paramétrique de l'intensité de fluorescence APC en fonction de l'intensité de fluorescence PE des cellules de la population P2
- Schéma 30 : Schéma du principe du tri cellulaire
- Schéma 31 : Représentation bi-paramétrique de l'intensité de fluorescence APC en fonction de l'intensité de fluorescence PE des cellules issues des tubes collecteurs après le tri cellulaire.

RESULTATS

Publication 1 :

- Figure 1 : Les peptides d'élastine diminuent l'expression des cytokines pro-inflammatoires induite par le LPS dans les monocytes humains.
- Figure 2 : Les peptides d'élastine n'affectent ni l'expression du récepteur CD14/TLR-4 ni la fixation du LPS sur les monocytes humains.
- Figure 3 : L'interaction des peptides d'élastine avec leur récepteur S-gal diminue l'expression des cytokines pro-inflammatoires induite par le LPS.
- Figure 4 : Les peptides d'élastine inhibent la translocation nucléaire de NF- κ B induite par le LPS.
- Figure 5 : Les peptides d'élastine inhibent la dégradation d'I κ B- α induite par le LPS dans les monocytes.

Figure 6 : Les peptides d'élastine diminuent l'expression des cytokines pro-inflammatoires dans les mélanocytes activés.

Publication 2 :

Figure 1 : Les peptides d'élastine induisent la chemo-attraction des cellules dendritiques immatures (imCD) via leur interaction avec le récepteur de l'élastine.

Figure 2 : Les peptides d'élastine augmentent la production de cytokines pro-inflammatoires par les imCD.

Figure 3 : Les peptides d'élastine n'induisent pas la maturation des CD.

Figure 4 : Les peptides d'élastine inhibent la maturation des CD induite par le TNF- α et LPS.

Figure 5 : Les peptides d'élastine polarisent la différenciation des CD vers un profil tolérogénique.

Figure 6 : Les peptides d'élastine inhibent la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ induite par les CD matures.

Contexte scientifique

L'organisme humain se défend contre les agressions de microorganismes (bactéries, virus, champignons, protozoaires,...) présents dans son environnement immédiat par le biais du système immunitaire. La complexité du système immunitaire réside dans sa capacité à pouvoir différencier rapidement d'une part les antigènes étrangers afin de les éliminer, et, d'autre part les antigènes du Soi afin de les tolérer. La réponse du système immunitaire à une agression est classiquement divisée en deux phases : la réponse innée (ou naturelle) et la réponse adaptative (ou spécifique).

L'inflammation, qui est une des composantes de la réponse innée, nécessite l'établissement d'un réseau complexe d'interactions entre les cellules et leur environnement. Ces interactions sont finement régulées par de nombreux facteurs solubles (cytokines, chimiokines,...) pour que la réponse soit parfaitement adaptée afin d'éliminer l'agent pathogène sans avoir d'effets secondaires trop importants sur l'organisme. Ainsi, l'inflammation est un processus habituellement bénéfique (destruction des pathogènes et réparation tissulaire) mais qui peut devenir délétère lorsqu'il perdure et qu'il conduit à des dégradations locales non contrôlées. Lors de la réponse inflammatoire, les cellules sécrètent de nombreuses protéases qui participent au remodelage tissulaire en trouvant de nombreuses cibles au sein de la Matrice Extracellulaire (MEC).

La MEC est un réseau tridimensionnel de macromolécules (élastine, collagènes, laminines, fibronectine, glycosaminoglycannes,...) qui servent de support architectural et qui permettent la cohésion des tissus. La dégradation des molécules de la MEC conduit à la production de peptides, appelés "matrikines", et dont les propriétés biologiques diffèrent de la molécule dont ils sont issus. Ces matrikines ont la capacité d'influencer le comportement des cellules présentes dans leur environnement. L'élastine est une molécule de la MEC présente en quantité importante dans les tissus caractérisés par une composante élastique essentielle à leurs fonctions. C'est le cas de la peau, des artères et des poumons. Depuis plusieurs années, l'élastine est décrite comme une cible importante au cours des pathologies inflammatoires touchant les tissus élastiques et caractérisées par une synthèse excessive de protéases à activité élastinolytique. Au cours de ces pathologies, l'élastine est le siège d'une dégradation intense qui génère la production de peptides d'élastine solubles. Ces peptides sont doués de nombreuses activités biologiques qu'ils exercent par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique

mis en évidence à la surface de nombreuses cellules. Ainsi, l'interaction des peptides d'élastine avec leur récepteur spécifique confère à ces peptides des propriétés diverses telle que des capacités de chimiotactisme, de régulation de la prolifération ou encore de contrôle du tonus vasculaire. Ces peptides ont également été décrits comme impliqués dans la régulation de l'expression des cytokines. Ainsi, les peptides d'élastine polarisent la réponse lymphocytaire T vers un profil cytokinique de type Th-1 et régulent la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β dans les cellules de mélanome.

Cependant, le rôle des peptides d'élastine au cours de la réponse inflammatoire ou immunitaire siégeant dans des tissus riches en élastine reste à déterminer. Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons émis l'hypothèse que les peptides issus de la dégradation de l'élastine dans des pathologies où co-existe une forte composante inflammatoire pouvaient participer à la régulation des cellules immunitaires mises en jeu.

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit a porté sur l'étude de la régulation des monocytes et des cellules dendritiques humaines par les produits de dégradation de l'élastine.

Le manuscrit est organisé en quatre parties :

La première partie est une introduction qui présente *i)* les connaissances actuelles sur les peptides issus de la dégradation de l'élastine, *ii)* les populations cellulaires (monocytes, cellules dendritiques) et les médiateurs solubles qui ont été étudiés au cours de ce travail, et *iii)* la mise en jeu de ces différents acteurs au cours des pathologies où une forte dégradation de l'élastine est associée à une importante réaction inflammatoire.

La seconde partie consiste en un « matériels et méthodes » présentant les techniques d'isolement des populations cellulaires utilisées au cours de notre étude et qui ont été peu détaillées dans le contenu des articles présentés dans ce manuscrit.

La troisième partie présente, au travers de deux articles, l'ensemble des résultats que nous avons obtenus au cours de ce travail de thèse. Une première série de résultats est présentée dans un article intitulé *"Elastin receptor (S-gal) occupancy by elastin peptides counteracts pro-inflammatory cytokines expression in LPS-stimulated human monocytes through NF- κ B down-regulation"* qui a été accepté pour publication dans *"The Journal of Immunology"*. La deuxième partie des résultats obtenus est présentée dans un second article intitulé *"Elastin*

peptides prevent human dendritic cells maturation and induce generation of tolerogenic dendritic cells" qui a été soumis pour publication dans "*The Journal of Immunology*".

Enfin, la quatrième partie s'organise en une discussion/conclusion sur le rôle des peptides d'élastine dans la régulation de l'inflammation et de la réponse immunitaire et sur la prise en compte des fonctions biologiques de ces peptides dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques dans lesquels ils peuvent être impliqués.

Chapitre 1 : Elastine et peptides d'élastine

Les fonctions physiologiques de nombreux tissus sont chez l'Homme dépendantes de leurs propriétés élastiques. Les fibres élastiques présentes dans la matrice extracellulaire (MEC) de ces tissus leur confèrent des capacités de déformation importante et leur permettent un retour passif à l'état initial, sans dépense d'énergie (Rosenbloom *et al.*, 1993). Ces propriétés élastiques sont indispensables au bon fonctionnement des artères, des poumons, de la peau et de tous les tissus dynamiques qui nécessitent des cycles répétés d'extension et de relâchement.

Les propriétés rhéologiques des fibres élastiques sont principalement assurées par l'élastine qui représente 50% de la masse sèche des ligaments, 30% de l'aorte thoracique et des grands vaisseaux, 7% des poumons et 3% de la peau (Uitto *et al.*, 1991). Bien que l'élastine ne représente parfois qu'un faible pourcentage de la MEC, son rôle est primordial au cours des changements dynamiques auxquels sont soumis ces tissus.

Un rôle prépondérant est attribué aux fibres élastiques dans la pathogenèse des pathologies inflammatoires impliquant une perte d'élasticité des tissus comme cela est le cas par exemple dans l'athérosclérose (Saulnier *et al.*, 1991) et dans l'emphysème (Dillon *et al.*, 1992).

A. Genèse de l'élastine

La formation des fibres élastiques requiert la mise en place et la coordination de plusieurs processus. Ces processus comprennent *i)* le contrôle de la transcription et de la traduction de la tropoélastine qui est le précurseur soluble de l'élastine, *ii)* la signalisation intracellulaire et la sécrétion de la tropoélastine, *iii)* l'alignement des monomères de tropoélastine et, enfin, *iv)* la conversion de la tropoélastine en polymères d'élastine insolubles.

1. La tropoélastine

Les tropoélastines de diverses espèces et notamment celle de l'Homme (Indik *et al.*, 1987) ont été séquencées. Elles présentent toutes une forte homologie tant au niveau du gène qu'au niveau de la protéine. La tropoélastine se présente toujours sous la forme d'une alternance de domaines hydrophiles et de domaines fortement hydrophobes (Vrhovski and Weiss., 1998). Les domaines hydrophiles sont riches en lysine et en alanine et sont impliqués dans la formation des liaisons croisées de l'élastine. Les domaines hydrophobes sont riches en acides

aminés apolaires (glycine, valine, proline et alanine) et portent le domaine de liaison de l'élastine sur son récepteur.

La tropoélastine humaine contient un peptide signal de 26 acides aminés et est sécrétée sous la forme d'une protéine d'approximativement 72 kDa (Indik *et al.*, 1987). Les variations de taille observées au niveau de la protéine sont liées à l'existence de différentes isoformes de la tropoélastine. Chez l'homme, le domaine hydrophobe, codé par l'exon 24, présente six répétitions de l'hexapeptide VGVAPG qui est considéré comme le domaine de liaison de l'élastine à son récepteur (Tableau 1). Le domaine C-terminal de la tropoélastine est un domaine très conservé au sein des espèces.

Domaine	Séquence
Domaine hydrophobe	GLVPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVAPGVGV LAPG VGVAPGVGVAPGVGVAPGIGPGGVA
Domaine hydrophile	GVVSPEAAAKAAAKAAKY

Tableau 1 : Séquences en acides aminés des deux domaines critiques de la tropoélastine

2. Le gène de l'élastine

Le gène de l'élastine humaine qui code pour la tropoélastine humaine est un exemplaire unique localisé sur la région proximale du bras long du chromosome 7, au locus 7q11.23 (Fazio *et al.*, 1991). Le transcrit primaire a une taille d'environ 45 kb et est composé de 34 exons de petite taille (27 à 165 pb) séparés par des introns de grande taille conduisant à un ratio exon/intron inhabituel (Piontkivska *et al.*, 2004). La structure de l'ADNc de la tropoélastine est caractéristique de la structure de la protéine, en ce sens qu'elle est organisée en une alternance d'exons codant pour les domaines hydrophobes et d'exons codant pour les domaines hydrophiles impliqués dans les liaisons croisées (Schéma 1). Par ailleurs, sept exons subissent un épissage alternatif (Zhang and Parks., 1999) aboutissant à des structures de la protéine adaptées aux différents tissus possédant des propriétés élastiques (Piontkivska *et al.*, 2004).

De nombreuses variations du gène de l'élastine ont été observées dans différentes espèces. Ainsi, les exons 34 et 35 sont absents du gène humain (Szabo *et al.*, 1999) alors que l'exon 26A est retrouvé uniquement dans l'espèce humaine. La fonction précise de l'exon 26A n'est pas connue à ce jour mais sa délétion conduit à la formation d'une isoforme de la

tropoélastine uniquement retrouvée au cours de certaines pathologies rares telles que l'hypertension artérielle pulmonaire (Debelle and Tamburro., 1999). Enfin, l'exon 36 est très conservé entre les différentes espèces (>70 %) et code pour la partie C-terminale de la protéine (Schéma 1).

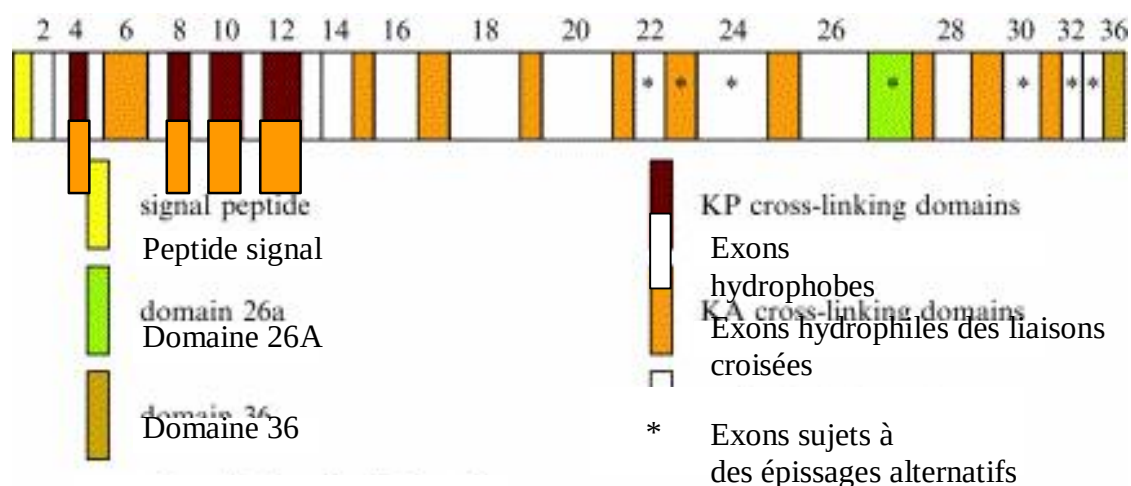


Schéma 1 : Structure de l'ADNc de la tropoélastine humaine
(d'après Vrhovski *et al.*, 1999).

3. Régulation de l'expression du gène de l'élastine

L'élastogénèse a lieu essentiellement à la fin du stade fœtal et aux stades précoces du développement néonatal. L'élastine est synthétisée et sécrétée par plusieurs types cellulaires comme les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les chondroblastes (Uitto *et al.*, 1991). Une fois que l'élastine est déposée au niveau tissulaire, sa synthèse cesse et son renouvellement est très faible tout au long de la vie (demi-vie d'environ 70 ans) (Dillon *et al.*, 1992 ; Petersen *et al.*, 2001). Cependant, au cours de certains processus pathologiques associés à une forte dégradation de l'élastine, une néosynthèse de la protéine peut rapidement se mettre en place (Davidson., 2002).

Il existe plusieurs éléments de contrôle du gène de l'élastine humaine. Le promoteur du gène de l'élastine humaine ne contient pas de TATA box mais de nombreux éléments *cis-régulateurs* servant de sites potentiels de fixation aux facteurs de transcription SP-1 et AP-2 (Uitto *et al.*, 1991). Huit points d'initiation de la transcription ont été identifiés dans le promoteur du gène de l'élastine humaine (Bashir *et al.*, 1989; Rosenbloom *et al.*, 1991). De nombreux facteurs exogènes régulent la transcription de l'élastine, c'est le cas de l'*insuline-like growth factor-1* (IGF-1) (Conn *et al.*, 1996), de l'IL-10 (Reitamo *et al.*, 1994) et de l'IL-

1 β (Mauviel *et al.*, 1993) qui activent l'expression du gène, c'est également le cas du TNF- α (Kahari *et al.*, 1992) et du b-FGF (Carreras *et al.*, 2002) qui répriment l'expression du gène. L'expression du gène de l'élastine est également régulée au niveau post-transcriptionnel. A ce niveau, c'est la dégradation des ARNm qui semble être le mécanisme principal de régulation (Parks., 1997). Le TGF- β 1 est un activateur puissant de la synthèse de tropoélastine en augmentant la stabilité de l'ARNm. Le TGF- β 1 agit en diminuant la fixation, sur l'ARNm, de protéines cytosoliques qui déstabilisent cet ARNm (Zhang and Parks., 1999).

Ainsi, il apparaît que l'induction et le maintien de l'élastogénèse sont contrôlés par des mécanismes transcriptionnels alors que l'arrêt de l'expression de la tropoélastine est principalement contrôlé par des mécanismes post-transcriptionnels.

4. Sécrétion de la tropoélastine

L'ARNm mature de la tropoélastine est exporté du noyau et la protéine est synthétisée à la surface du réticulum endoplasmique rugueux (RER) sous la forme d'un polypeptide de 70 kDa avec une séquence signal en position N-terminale (Grosso and Mecham., 1988). La protéine transite alors dans le lumen du RER où le peptide signal est clivé puis la protéine est transportée vers l'appareil de Golgi. La tropoélastine ainsi obtenue se complexe alors avec l'Elastin Binding Protein (EBP) qui joue le rôle de protéine chaperonne en empêchant l'agrégation intracellulaire et la dégradation prématurée de la protéine (Hinek., 1995). L'EBP se lie aux domaines hydrophobes de la tropoélastine (Hinek., 1995). L'interaction EBP/tropoélastine se fait avec une très haute affinité ($K_d = 8$ nM) (Wrenn *et al.*, 1988). Le complexe EBP-tropoélastine est alors incorporé dans des vésicules puis transporté jusqu'à la membrane cellulaire où l'EBP se lie à une protéine protectrice (PP) de 55 kDa et une neuraminidase de 61 kDa formant ainsi le complexe récepteur de l'élastine (voir Chapitre 1, Section C).

5. Incorporation de la tropoélastine dans les fibres élastiques

Après incorporation du complexe EBP-tropoélastine à la membrane cellulaire, l'EBP libère la tropoélastine sur le site de formation de la fibre. La dissociation du complexe est la conséquence de l'interaction entre l'EBP et des résidus galactosucres présents sur les fibrillines constituant les microfibrilles du cytosquelette (Privitera *et al.*, 1998). Les monomères de tropoélastine libérés sont alors alignés, grâce à des interactions avec les microfibrilles, ce qui conduit à la formation des fibres élastiques. Les microfibrilles servent de matrice pour le dépôt, l'orientation et l'assemblage de la tropoélastine. Elles comprennent plusieurs glycoprotéines telles que la fibrilline 1 (Sakai *et al.*, 1986), la fibrilline 2 (Zhang *et*

al., 1994) et la *microfibril-associated glycoprotein* (MAGP-1) (Clarke and Weiss., 2004). Après la dissociation du complexe EBP-tropoélastine, l'EBP peut être internalisée par endocytose. A partir de la vésicule d'endocytose résultante, l'EBP est recyclée et peut à nouveau s'associer (Schéma 2).

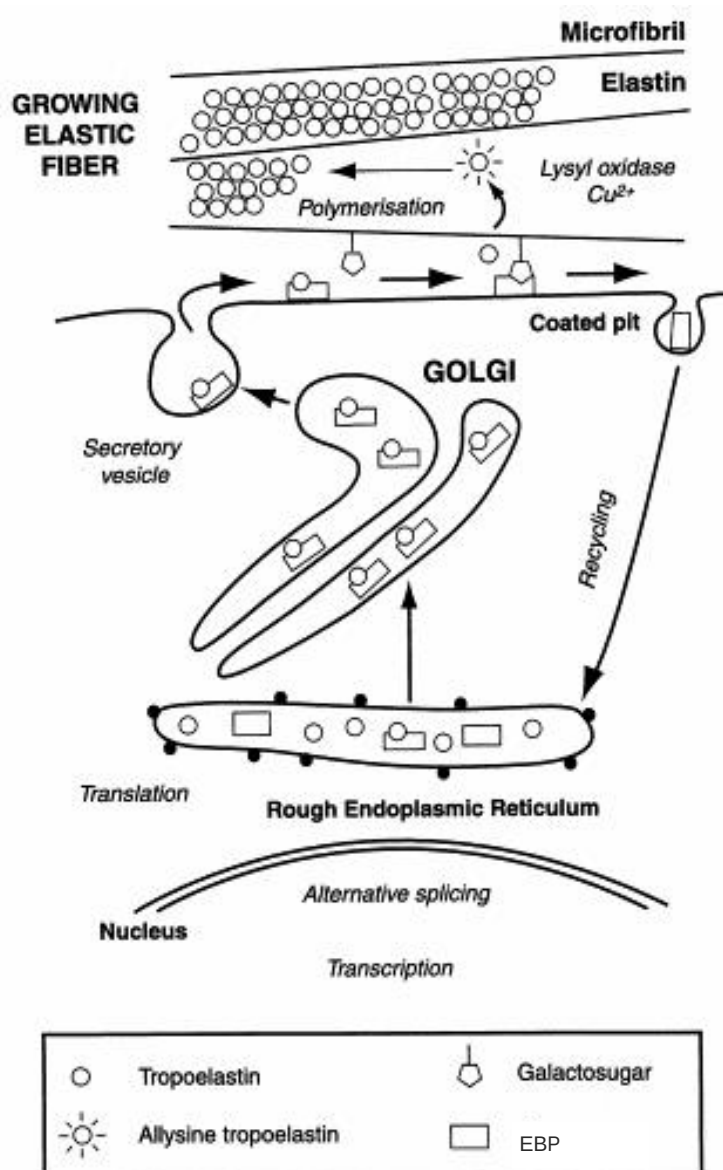


Schéma 2 : Description schématique de la formation des fibres élastiques
(d'après Debelle *et al.*, 1999)

L'incorporation de la tropoélastine dans les fibres élastiques en formation nécessite deux processus principaux : la coacervation et la formation des liaisons croisées. La coacervation permet d'aligner et de concentrer les molécules de tropoélastine afin de faciliter la formation des liaisons croisées (Urry *et al.*, 1978). La coacervation est un phénomène physique réversible basé sur des interactions entre les domaines hydrophobes de différentes molécules

de tropoélastine, interactions qui augmentent avec la température. Ainsi, les molécules de tropoélastine qui sont solubles à de faibles températures s'agrègent entre elles lorsque la température augmente. La coacervation optimale de la tropoélastine est réalisée à 37°C. La formation des liaisons croisées est, quant à elle, initiée par une enzyme dépendante du cuivre, la lysyl oxydase (LOX). La réaction catalysée par cette enzyme consiste en une désamination oxydative des résidus lysyls de la tropoélastine pour former un groupement allysine (Kagan and Cai., 1995). L'allysine est le précurseur des liaisons croisées retrouvées dans l'élastine. La condensation spontanée entre des résidus allysines et lysyls suffisamment proches permet la formation des liaisons croisées. L'intégrité structurale et fonctionnelle de l'élastine est assurée par différents types de liaisons croisées : les liaisons croisées bifonctionnelles (lysonorleucine et allysine-aldol), trifonctionnelles (merodesmosine) et tétrafonctionnelles (desmosine et isodesmosine) (Umeda *et al.*, 2001) (schéma 3).

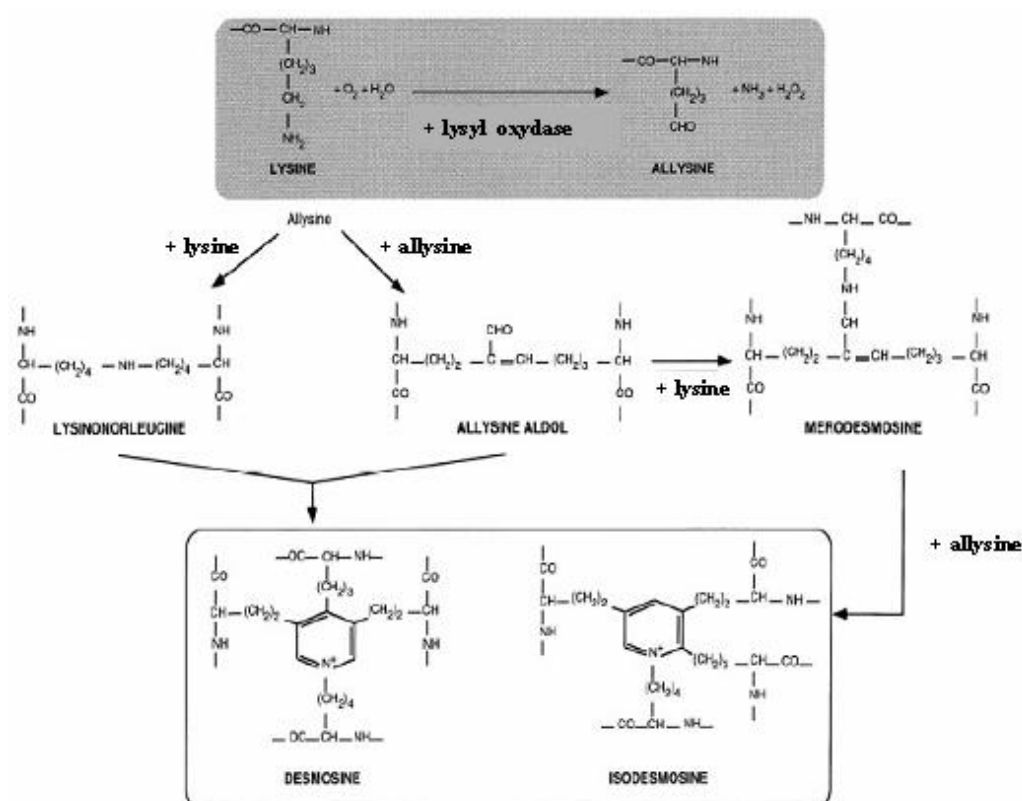


Schéma 3 : Structure et formation des liaisons croisées de l'élastine
(d'après Vrhovski *et al.*, 1998)

6. Structure de l'élastine mature

La conformation de l'élastine n'est pas connue de manière précise et il existe différentes théories quant aux mécanismes impliqués dans les phénomènes d'élasticité (Schéma 4). La difficulté d'étude de la structure de l'élastine repose sur le fait qu'elle ne possède pas de structure stable dans la mesure où elle est en perpétuel mouvement. Cependant, quelques études suggèrent que l'élastine fibreuse est un assemblage tridimensionnel de molécules de tropoélastine globulaires reliées entre elles, ce qui semble valider le modèle architectural dit de la "goutte liquide" (Debelle and Alix., 1999). Cette architecture de l'élastine fibreuse permet de rendre compte des capacités élastiques de la protéine en accord avec les mécanismes classiques d'entropie. Ainsi, la déformation des domaines globulaires par étirement expose les groupements hydrophobes à l'eau environnante, ce qui a pour effet de baisser l'entropie du système. Lorsque la force exercée est stoppée, le système revient à son état initial par augmentation de son entropie (Debelle and Tamburro., 1999).

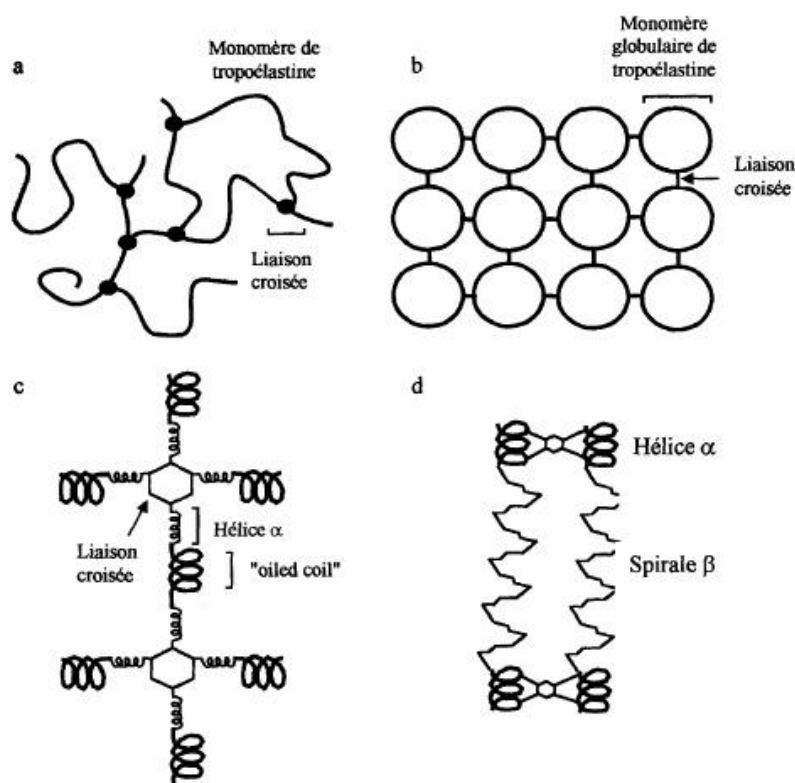


Schéma 4 : Modèles structuraux proposés pour l'élastine
(d'après Vrhovski *et al.*, 1998)

- a. Modèle du "réseau aléatoire" correspondant à des chaînes pontées arrangées aléatoirement dans une architecture tridimensionnelle quelconque.
- b. Modèle de la "goutte liquide" correspondant à des molécules de tropoélastine globulaire liées par des liaisons croisées.

c. Modèle "oiled coil" (dérivé du modèle de la "goutte liquide") correspondant à un domaine fibrillaire composé d'une alternance de liaisons croisées α -hélicoïdales et de larges rouleaux "oiled coil" formé par les domaines hydrophobes de la tropoélastine

d. Modèle "fibrillaire" consistant en des liaisons croisées α -hélicoïdales associées à une hélice relâchée, la spirale α , constituée par les domaines hydrophobes répétitifs de la tropoélastine. Dans ce modèle, les spirales α peuvent s'associer entre elles pour former de longs filaments qui maintiennent plusieurs chaînes ensemble

7. Structure des fibres élastiques

Les fibres élastiques sont constituées de deux composants différents mais indissociables, l'élastine et les microfibrilles. L'élastine, qui représente 90 % des fibres, forme la partie centrale de la fibre élastique. Cette zone est entourée par un réseau de microfibrilles. La disposition des fibres élastiques leur confère des propriétés rhéologiques qui diffèrent selon le tissu considéré (Pasquali-Ronchetti and Baccarani-Contrì, 1997). Ainsi, dans les artères, les fibres élastiques sont organisées en anneaux concentriques de lamelles d'élastine qui entourent les vaisseaux (Li *et al.*, 1998) alors que dans les poumons ces fibres forment une matrice sur l'ensemble de l'organe avec des zones de concentration au niveau des jonctions alvéolaires (Starcher., 2000) (Schéma 5).

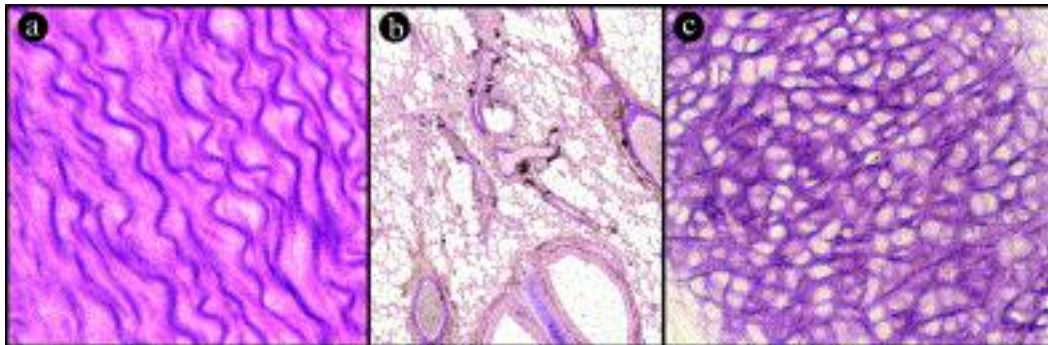


Schéma 5 : Organisation des fibres élastiques dans l'aorte (a), le poumon (b) et le cartilage de l'oreille (c) (d'après Mithieux et Weiss, 2005)

8. Dégradation de l'élastine

Chez les sujets sains, les propriétés hydrophobes de l'élastine ainsi que sa richesse en liaisons croisées font de cette macromolécule un polymère très résistant dont la dégradation est très lente. Cependant, avec le vieillissement ou au cours de certaines pathologies ou blessures, une dégradation excessive et un remodelage aberrant des fibres élastiques peuvent être observés dans les tissus contenant des quantités importantes d'élastine (Osakabe *et al.*, 2001 ; Robert *et al.*, 1995). La dégradation de l'élastine insoluble est alors due à un groupe

d'enzymes protéolytiques, regroupées dans la famille des élastases (Faury., 2001). Un large éventail de ces protéases élastinolytiques existe dans les cellules et les tissus humains. Ces protéases se divisent en quatre classes catalytiques (Novinec *et al.*, 2007) , *i*) les protéases à acide aspartique dont la cathepsine D (Collins and Fine., 1981), *ii*) les protéases à cysteines, dont les cathepsines K, L et S (Sukhova *et al.*, 2005), *iii*) les sérine-élastases dont l'élastase du neutrophile, la cathepsine G, et la protéinase 3 (Pardo, 1999), (Punturieri, 2000), et, *iv*) les métalloprotéinases matricielles (MMP) dont les MMP-2, -7, -9, et -12 (Hornebeck *et al.*, 2002).

B. Les peptides d'élastine

Les peptides issus de la dégradation de l'élastine sont présents *in vivo* à la fois dans des conditions physiologiques et pathologiques (Wei *et al.*, 1993). Cependant, l'origine de ces peptides n'a pas été clairement démontrée même s'il semble vraisemblable qu'ils proviennent de la dégradation des fibres élastiques par les élastases. Les peptides d'élastine obtenus par protéolyse et capables d'exercer des fonctions biologiques et de modifier le comportement de nombreux types cellulaires font partie de la famille des "matrikines" qui regroupe l'ensemble des peptides issus de la dégradation des protéines de la MEC (Maquart *et al.*, 2004). Plus spécifiquement, les peptides solubles d'élastine provenant de la dégradation de l'élastine sont nommées "élastokines".

1. Origine des peptides d'élastine

Le terme "peptides d'élastine" désigne non seulement les produits issus de la digestion enzymatique de l'élastine mais également les produits obtenus par hydrolyse chimique. En effet, les peptides d'élastine peuvent être obtenus par hydrolyse chimique à base d'acide oxalique, ce qui aboutit à la formation d' α -élastine (PARTRIDGE *et al.*, 1955), ou bien par hydrolyse avec de l'hydroxyde de potassium conduisant à l'obtention de la κ -élastine (Jacob *et al.*, 1984). L'hydrolyse chimique conduit à l'obtention d'un mélange de peptides d'élastine. A l'inverse, il est possible, par synthèse peptidique chimique, d'obtenir un seul type déterminé de peptide afin d'appréhender de façon spécifique le rôle biologique du peptide ou sa structure. Le plus étudié des peptides d'élastine est le peptide VGVAPG dont la séquence qui est codée par l'exon 24 de la tropoélastine humaine, correspond à la partie minimale de la protéine capable d'activer le récepteur de l'élastine.

2. Peptides d'élastine et activités biologiques

Les peptides issus de la dégradation de l'élastine ne sont pas de simples produits de dégradation inertes de la matrice. Ces peptides sont, pour un grand nombre d'entre eux, dotés d'activités biologiques qu'ils exercent vis-à-vis de différents types cellulaires (Tableau 2). La plupart des effets biologiques des peptides d'élastine a été imputée à la présence d'un complexe récepteur de l'élastine à la surface des cellules cibles (Duca *et al.*, 2004).

Activités biologiques	Cellules	Nature des peptides d'élastine	Références
Chimiotactisme	Monocytes	VGVPAG, LREGDPSS, κ E	[30], [31], [164], [214], [366], [412]
	Fibroblastes	VGVPAG, LGTIPG, PGAIPG, GFGVGAGVP,	[155], [254], [364]
	Cellules musculaires lisses	κ E	[301]
	Cellules endothéliales	VGVPAG, GFGVGAGVP, GLGVGAGVP	[253]
	Mélanomes A2058	LGTIPG	[269]
	Carcinomes pulmonaires	PGAIPG, VGVPAG	[35], [36], [155], [453],
	Neutrophiles	PGAIPG	[155]
Prolifération	Lymphocytes	κ E	[321]
	Fibroblastes	κ E, VGVPAG	[143], [215], [405]
	Cellules musculaires lisses	κ E, VGVPAG, VPGVG	[276], [429]
Synthèse de proteases	Leucocytes	κ E, VGVPAG	[127], [166]
	Mélanome M1Dor et M3Da	κ E	[296]
Modifications des flux ioniques	Monocytes	κ E	[200] [127]
	Fibroblastes	κ E	[200]
	Cellules musculaires lisses	κ E	[200]
Augmentation de la consommation d'oxygène	Monocytes	κ E	[127]
	Leucocytes	κ E	[423]
Vasorelaxation et libération de NO	Cellules endothéliales	κ E	[113]
Inhibition de la synthèse de cholestérol	Monocytes	κ E	[423]
Angiogénèse	Cellules endothéliales	VGVPAG	[338]
Induction de l'apoptose	Lymphocytes	κ E	[317]
Synthèse de cytokines	Lymphocytes	κ E	[85]
	Mélanomes M3Da	κ E	[86]

Tableau 2 : Effets biologiques des peptides d'élastine
(D'après Debret R., 2005).

C. Le complexe récepteur de l'élastine

C'est l'équipe de R.M. Senior et de ses collaborateurs qui fut première à suggérer dans les années 1980 l'existence d'un récepteur membranaire sur les monocytes et les fibroblastes permettant d'initier les effets biologiques des peptides d'élastine (Senior *et al.*, 1982 ; Senior *et al.*, 1984). Des études postérieures ont permis de montrer sans ambiguïté que de nombreux types cellulaires expriment le récepteur de l'élastine à leur surface ; c'est le cas *i)* des cellules produisant de l'élastine comme les fibroblastes, les chondroblastes ou les myocytes vasculaires (Hornebeck *et al.*, 1986), *ii)* des cellules du système immunitaire comme les lymphocytes, les monocytes et les polynucléaires neutrophiles (PNN) (Larbi *et al.*, 2005), et, *iii)* de certaines cellules tumorales (Hinek *et al.*, 1988). Par ailleurs, certains agents pathogènes comme les bactéries à Gram positif telles que *Staphylococcus aureus* possèdent un récepteur de surface (EbpS) de 25 kDa leur permettant d'interagir avec la région N-terminale de la tropoélastine soluble, interaction qui facilite l'infection bactérienne des tissus riches en élastine (Downer *et al.*, 2002).

Le complexe récepteur de l'élastine est constitué de 3 sous-unités (Wrenn *et al.*, 1988) (Schéma 6). La première sous-unité d'un poids moléculaire de 67 kDa est l'EBP qui est située à la périphérie de la membrane plasmique de la cellule. Les deux autres sous-unités qui sont ancrées dans la membrane plasmique pour stabiliser l'EBP, sont la protéine protectrice/cathepsine A (PPCA) et la neuraminidase-1 (Neu-1) respectivement d'un poids moléculaire de 55 et 61 kDa (Mecham *et al.*, 1989).

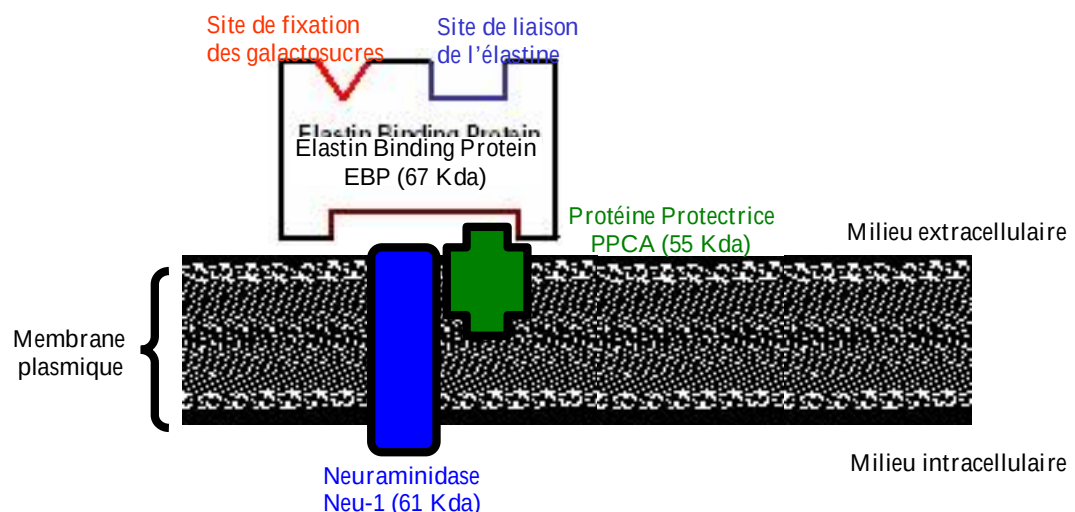


Schéma 6 : Le complexe récepteur de l'élastine.

(d'après Vrhovski *et al.*, 1998)

1. Structure du complexe récepteur de l'élastine

1.1. L'Elastin Binding Protein (EBP)

L'équipe d'A. Hinek et collaborateurs a caractérisé, dans les années 1990, l'EBP au niveau structural, biochimique et moléculaire (Hinek., 1994 ; Hinek., 1996). Cette protéine de 67 kDa est un variant d'épissage de la β -galactosidase humaine conduisant à un mutant inactif sur le plan enzymatique nommé Spliced galactosidase (S-gal) (Hinek *et al.*, 1993 ; Privitera *et al.*, 1998) (Schéma 7).

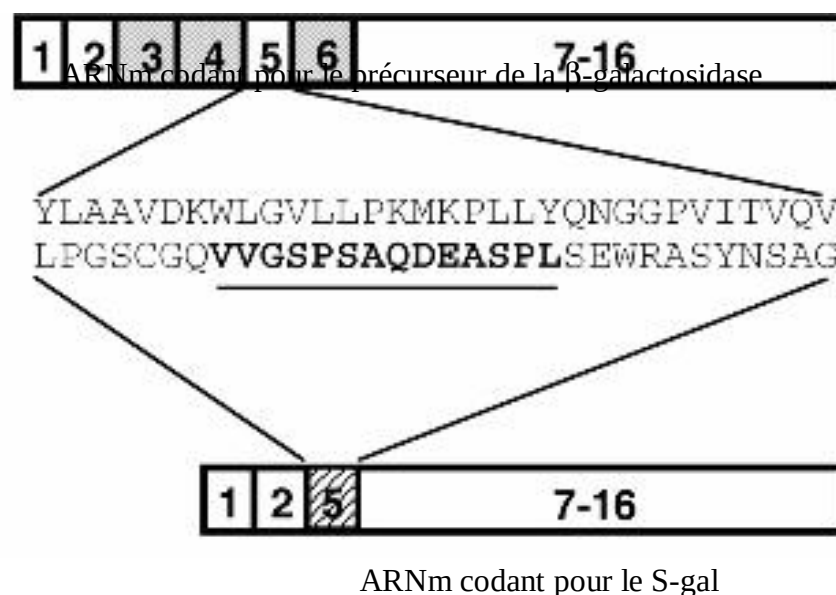


Schéma 7 : Epissage alternatif du transcrit primaire de la β -gal. Les exons 3, 4 et 6 sont épissés et le cadre de lecture de l'exon 5 est décalé ce qui fait apparaître une région de 32 acides aminés caractéristique du S-gal (D'après Privitera, 1998).

L'EBP est une protéine chaperonne qui facilite l'assemblage des fibres élastiques et le transport intracellulaire de la tropoélastine dans les cellules qui produisent l'élastine (Hinek., 1995). Cette protéine existe aussi à la surface de nombreuses cellules productrices ou non d'élastine en tant que récepteur des peptides d'élastine. Les fonctions de l'EBP sont altérées dans certaines pathologies du système cardiovasculaire comme l'athérosclérose (Faury., 1998).

Des études récentes de modélisations moléculaires (Moroy *et al.*, 2005) ont montré que de nombreux peptides contenant une séquence consensus GXXPG et possédant une structure en coude β de type VIII pouvaient être des ligands de l'EBP en interagissant avec le site de liaison à l'élastine présent à la surface de l'EBP. C'est le cas du peptide d'élastine VGVAPG

qui est un ligand de haute affinité pour l'EBP, c'est également le cas pour d'autres peptides d'élastine possédant un motif GXXPG, c'est le cas enfin du domaine 7S du collagène de type IV et de la séquence LGTIPG présente dans la laminine (Mecham *et al.*, 1989 ; Senior *et al.*, 1989).

L'EBP possède un second site de fixation (autre que le site de liaison à l'élastine) permettant d'interagir avec des galactosucres comme le lactose, le galactose ou certains glycosaminoglycanes comme la chondroïtine sulfate présente dans les tissus conjonctifs (Hinek *et al.*, 1988). La liaison d'un galactosucré spécifique sur ce second site de fixation induit un changement de conformation de l'EBP, ce qui provoque la dissociation du récepteur de la surface cellulaire et une perte d'efficacité biologique des peptides d'élastine (Mecham *et al.*, 1991) (Schéma 8).

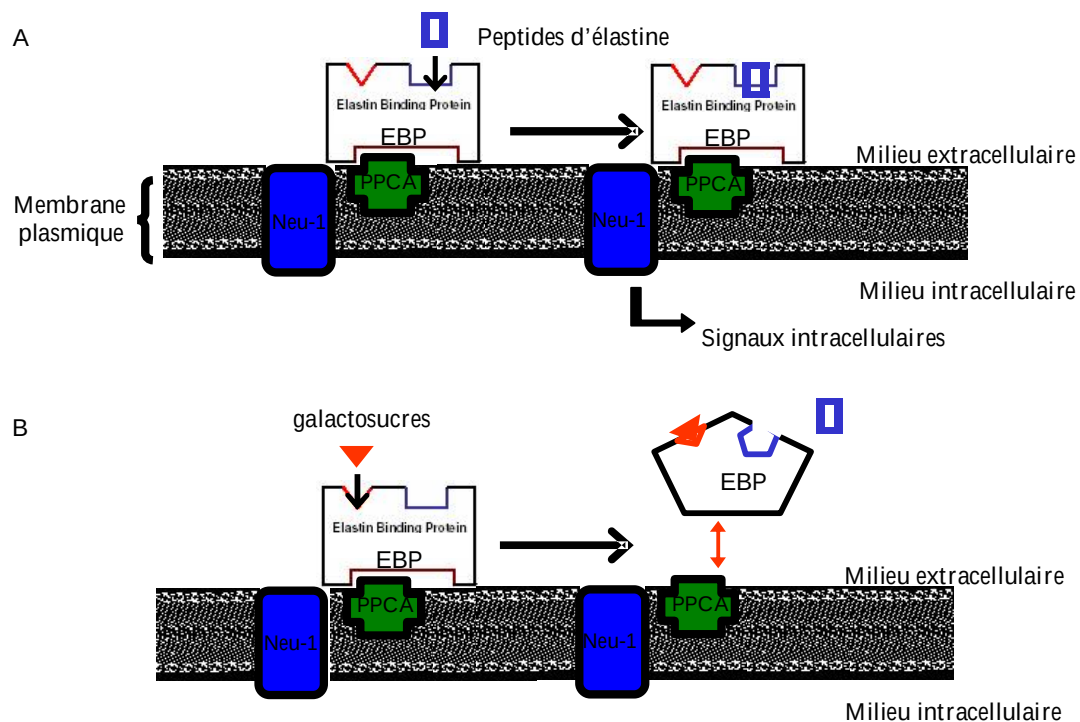


Schéma 8 : Activation du complexe récepteur de l'élastine
(d'après Vrhovski *et al.*, 1998).

A. Fixation des peptides d'élastines sur l'EBP et induction des voies de signalisations associées.

B. Fixation d'un galactosucré sur l'EBP et changement de conformation de l'EBP qui se détache du complexe.

1.2. La Protéine Protectrice/Cathepsine A (PPCA)

La PPCA (EC 3.4.16.1) est une protéine synthétisée sous la forme d'un zymogène de 54 kDa dont le clivage dans le lysosome conduit à la formation de deux sous-unités de 32 et 20 kDa reliées entre elles par des ponts disulfures (Morreau *et al.*, 1992). Cette protéine se lie dans un premier temps au précurseur de la β -galactosidase pour faciliter sa sortie du RER et stabilise, dans un second temps, la β -galactosidase mature dans le lysosome (Morreau *et al.*, 1992). La PPCA est également indispensable au transport intracellulaire, à la stabilité et à l'activité enzymatique de la neuraminidase (van der *et al.*, 1998). Indépendamment de ces fonctions protectrices, la PPCA est dotée d'activités enzymatiques dépendantes du pH. Elle peut ainsi se comporter dans un environnement acide comme une carboxypeptidase, ou comme une désaminase et une estérase à pH neutre (Galjart *et al.*, 1991). Au sein du complexe récepteur de l'élastine, la PPCA semble exercer uniquement des fonctions protectrices de l'EBP et de la neuraminidase.

1.3. La neuraminidase (Neu-1)

La neuraminidase présente dans le complexe récepteur de l'élastine est la neuraminidase lysosomale ou neuraminidase-1 [(Neu-1); EC 3.2.1.18] (Bonten *et al.*, 1995) sécrétée sous forme d'une pré-pro-enzyme de 45 kDa devenant mature par clivage protéolytique (Callahan., 1999). En raison d'un taux de glycosylation variable, cette protéine a une masse moléculaire allant de 48,3 kDa à plus de 60 kDa (Achyuthan and Achyuthan., 2001). Cette enzyme transmembranaire est responsable du clivage de résidus d'acide sialique en position terminale de parties glycanes portées par différents sialo-conjugués protéiques ou lipidiques (Seyrantepe *et al.*, 2003). La Neu-1 est la seule enzyme de la famille des sialidases qui nécessite une autre protéine, la PPCA, pour être active. Dans les cellules, le complexe Neu-1/PPCA est trouvé à la fois dans les lysosomes et fixé à la membrane plasmique. La distribution intracellulaire de Neu-1 est contrôlée par un signal d'internalisation qui est similaire aux signaux trouvés au sein des récepteurs membranaires endocytés. En effet, Neu-1 contient en position C-terminale la séquence ⁴¹²YGTL⁴¹⁵ qui semble représenter un site de fixation pour des complexes protéiques AP2 (Adaptator Protein complex 2) impliqués dans l'internalisation de récepteurs couplés aux protéines G (Lukong *et al.*, 2001).

D'une façon générale, Neu-1 possède un rôle important dans la signalisation cellulaire. Ainsi, cette enzyme provoque la désialylation de glycoconjugués présents à la surface des monocytes conduisant ainsi à l'activation de la voie Erk1/2 et à l'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires (Stamatos *et al.*, 2004). De plus, la Neu-1 est

exprimée à la surface des lymphocytes T où elle participe à la désialylation de la chaîne lourde de classe 1 de la myosine, processus nécessaire pour rendre les lymphocytes T sensibles aux cellules présentatrices d'antigènes (Landolfi and Cook., 1986). Neu-1 est également responsable de la désialylation d'un ganglioside impliqué dans la production d'IL-4 par les lymphocytes T (Chen *et al.*, 1997).

Au sein du complexe récepteur de l'élastine, le rôle exact de la Neu-1 dans la transmission du signal intracellulaire n'a pas été élucidé. Etant donné que la Neu-1 possède un petit domaine intracytoplasmique et une séquence caractéristique en C-terminal, certains auteurs lui attribuent l'initiation du signal intracellulaire (Mochizuki *et al.*, 2002) mais aucun lien direct entre la Neu-1 et les effecteurs de signalisation du complexe récepteur de l'élastine n'a été clairement établi à ce jour. Cependant, des travaux récents ont montré que la stimulation de fibroblastes dermiques par des peptides d'élastine a pour conséquence la libération d'acide sialique et la formation de lactosylcéramide (LacCer), ce dernier pouvant être impliqué dans l'initiation des voies de signalisation induites par le récepteur de l'élastine (Duca *et al.*, 2007). Le LacCer dérive de la désialylation d'un glycoconjugué lipidique (GM3). Cette désialylation est induite par la Neu-1 (Chen *et al.*, 1997).

2. Transduction du signal intracellulaire

Le complexe récepteur de l'élastine joue un rôle dans l'assemblage des fibres élastiques mais sert également de récepteur pour les peptides issus de la dégradation de l'élastine. Les voies de signalisation mises en jeu lors de l'interaction récepteur/peptides d'élastine ne sont pas encore totalement élucidées, mais les données de la littérature montrent qu'en fonction du type cellulaire impliqué, différentes voies de signalisation sont activées (Schéma 9).

Ainsi, les peptides d'élastine induisent une augmentation du taux intracellulaire d'adénosine 3',5' monophosphate cyclique (AMPC), de guanosine 3',5' monophosphate cyclique (GMPc), de calcium ainsi que des dérivés actifs de l'oxygène dans les monocytes humains (Fulop, Jr. *et al.*, 1986). Dans ce même type cellulaire, les peptides d'élastine activent également une protéine kinase dépendante de la GMPc (PKG) (Uemura and Okamoto., 1997).

Dans les PNN, le complexe récepteur de l'élastine est couplé à une protéine G sensible à la toxine pertussique (PTX). La stimulation des PNN par les peptides d'élastine induit la formation d'inositol 3, 4, 5 trisphosphate (IP₃) (Varga *et al.*, 1989 ; Varga *et al.*, 1990) ce qui entraîne une augmentation significative de la concentration en calcium intracellulaire.

Dans les fibroblastes, l'interaction des peptides d'élastine avec le récepteur de l'élastine active une PKG conduisant au recrutement de la cascade Raf/MEK/Erk. Deux mécanismes

parallèles participent alors à l'activation de MEK ; d'une part la voie AMPc/Protéine Kinase A (PKA)/B-Raf et d'autre part le système protéine-G/phosphatidylinositol 3-kinase (PI₃-K)/Raf-1. L'activation de ces voies aboutit au recrutement du facteur de transcription AP-1 qui intervient dans l'activation de promoteurs de nombreux gènes (Duca *et al.*, 2002 ; Duca *et al.*, 2005).

Plus récemment, deux études ont montré que les peptides d'élastine activent les voies de signalisation Erk1/2 et P38 et mettent en jeu les facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B dans les LT humains et les cellules de mélanome (Debret *et al.*, 2005 ; Debret *et al.*, 2006).

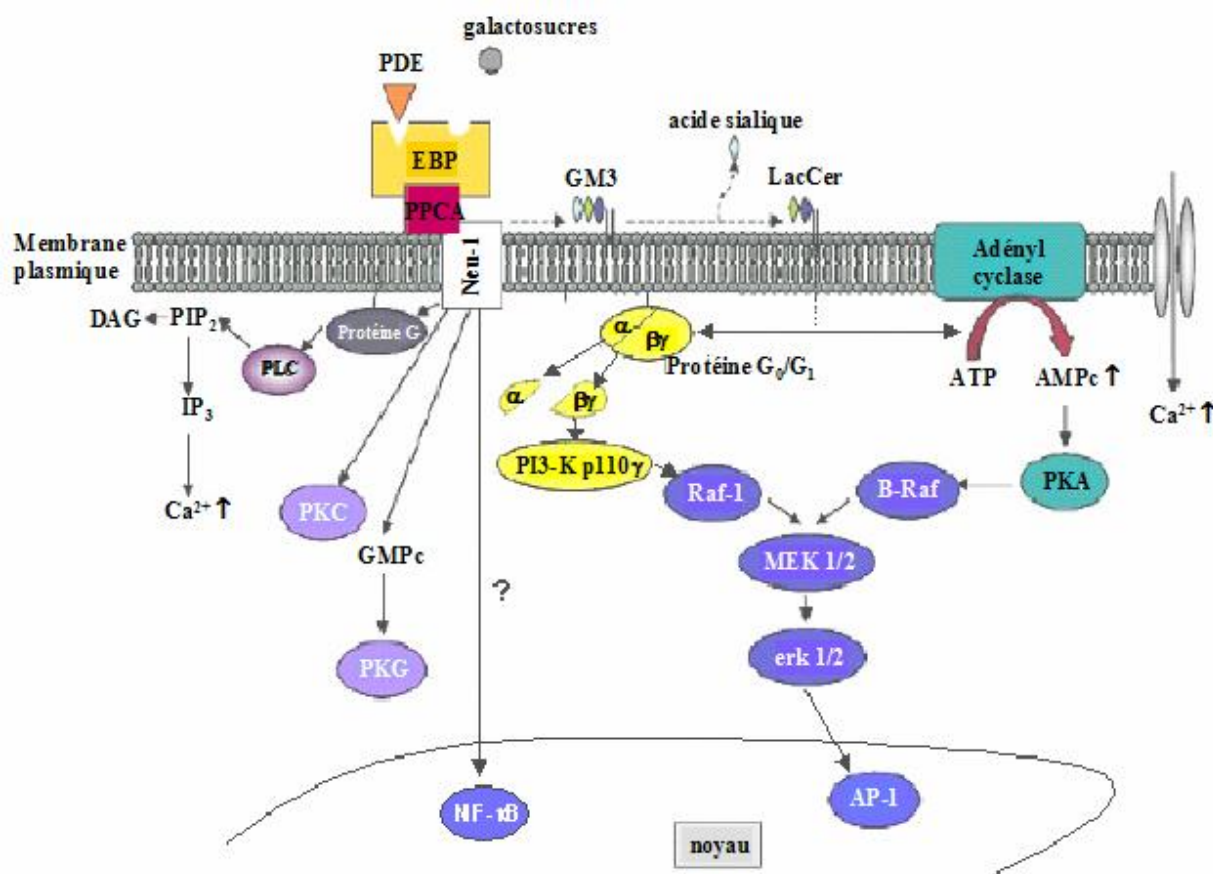


Schéma 9 : Schéma général des voies de signalisation induites par l'activation du complexe récepteur de l'élastine (D'après R. Debret, 2005).

Chapitre 2 : Monocytes et cytokines de l'inflammation

L'inflammation est caractérisée par l'accumulation de cellules et de facteurs sériques en réponse à un traumatisme déclenché par un stress, une lésion ou la présence d'agents pathogènes. Les cellules résidentes des tissus interagissent directement avec l'agent microbien et libèrent des médiateurs inflammatoires tels que les facteurs du complément, les cytokines, les chimiokines et les éicosanoïdes. Ces médiateurs permettent l'établissement de l'inflammation en activant les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, ce qui favorise le recrutement des cellules inflammatoires (polynucléaires neutrophiles (PNN), monocytes/macrophages,...). Les PNN sont recrutés massivement au site inflammatoire dans les premières heures de l'inflammation (6 à 12 heures) et disparaissent après 24 à 48 heures. Les monocytes, qui se différencient en macrophages, commencent à s'accumuler après 24 heures et remplacent progressivement les PNN.

Dans ce chapitre, nous nous sommes focalisés sur les propriétés biologiques des monocytes au cours de la réaction inflammatoire et plus précisément sur leur capacité à moduler la réponse inflammatoire par le biais de la synthèse de cytokines inflammatoires.

A. Les monocytes

Les monocytes représentent 2 à 10 % des leucocytes totaux chez l'Homme et sont issus des cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ de la moelle osseuse. Ces cellules sont de grands leucocytes (10 à 20 µm) caractérisés par un noyau en forme de fer à cheval et possédant de nombreux lysosomes qui contiennent un large panel d'enzymes. Les monocytes sont circulants pendant 24 heures avant de se différencier en différents types de cellules phagocytaires. Les monocytes sont à l'origine après différenciation, des macrophages, de certains types de cellules dendritiques, des ostéoclastes, des cellules microgliales et des cellules de Kupffer dans le foie (Naito *et al.*, 1997 ; Servet-Delprat *et al.*, 2002 ; Miyamoto *et al.*, 2001). Récemment, il a été démontré que les monocytes pouvaient aussi se différencier en un sous-type de cellules non phagocytaires renforçant ainsi le caractère multipotent parfois décrit pour les monocytes humains (Seta and Kuwana., 2007).

Les monocytes et les macrophages peuvent être stimulés par divers facteurs présents au niveau du foyer inflammatoire. Ces médiateurs sont représentés principalement par des cytokines comme le TNF- α et l'IL-1 β et/ou des endotoxines provenant par exemple des

bactéries à Gram négatif. Une fois activé, le monocyte/macrophage intervient à la fois dans la destruction de l'agent pathogène et dans l'entretien, l'amplification et l'arrêt de la réaction inflammatoire. Les monocytes/macrophages interviennent plus particulièrement dans l'amplification de l'inflammation par une libération massive de facteurs solubles de l'inflammation tels que les cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12). A l'opposé, leur implication dans le rétablissement de l'homéostasie au niveau du foyer inflammatoire se fait par une libération plus tardive de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 (Fujiwara and Kobayashi., 2005).

Les macrophages sont considérés comme les cellules pivot de l'inflammation chronique où ils constituent l'essentiel de l'infiltrat cellulaire du foyer inflammatoire. Ils y jouent un rôle prépondérant dans la destruction tissulaire et l'entretien du processus inflammatoire.

B. Les cytokines de l'inflammation

Les cytokines sont des protéines de poids moléculaire relativement faible (8 à 40 kDa) formées le plus souvent d'une seule chaîne polypeptidique. Elles sont en général glycosylées ce qui permet de les stabiliser et de faciliter leur solubilisation. Il n'existe pas de similitude de séquence primaire ou de structure tridimensionnelle entre toutes les cytokines et seules leurs activités biologiques permettent de les classer en différents groupes. Les cytokines agissent à de très faibles concentrations comme les hormones endocrines. Cependant, elles se distinguent des hormones par la diversité des cellules susceptibles de les synthétiser, par la diversité des cellules cibles sur lesquelles elles agissent, et enfin par la diversité de leurs activités qui peuvent être endocrines, paracrines ou autocrines. Les cytokines sont essentiellement impliquées dans l'inflammation et la réponse immunitaire.

Les cytokines ont des effets différents en fonction de leur cinétique d'intervention et de la cellule cible sur laquelle elles exercent leurs effets (O'Shea, 2002). Au cours du processus inflammatoire, les cytokines capables de promouvoir l'inflammation sont dites pro-inflammatoires (exemple du TNF- α , de l'IL-1 β et de l'IL-6) par opposition aux cytokines limitant ce phénomène (exemple de l'IL-10 et du TGF- β) qui sont dites anti-inflammatoires (Dinarello., 2000).

1. Le facteur de nécrose des tumeurs alpha (TNF- α)

Le TNF- α est le membre le plus étudié de la superfamille des "tumor necrosis factor". Cette famille est constituée de facteurs solubles et membranaires régulant les systèmes de

défense immunitaire, la survie cellulaire et l'organogenèse. Elle compte plus de 40 systèmes ligands-récepteurs (Ware., 2003).

Le TNF- α est principalement sécrété par les macrophages et a été initialement découvert pour sa propriété de nécrose des tumeurs (Carswell *et al.*, 1975). Il présente un large spectre d'activités. Il induit la libération de prostaglandines et de protéases par les fibroblastes (Alvaro-Gracia *et al.*, 1990), ainsi que la libération de médiateurs de l'inflammation (IL-1, IL-6, PAF) par les monocytes (Cavaillon and Haeffner-Cavaillon., 1993). Il provoque une augmentation de la phagocytose par les PNN et l'augmentation de l'expression des antigènes de classe I et de classe II sur différents types cellulaires (Mueller *et al.*, 2005). Par ces multiples effets, le TNF- α apparaît comme un médiateur essentiel dans l'inflammation.

1.1. Structure du gène et de la protéine

Le gène du TNF- α humain est localisé sur le chromosome 6 et la protéine est codée par une séquence unique de 3,6 kb comportant trois introns et quatre exons (Nedwin *et al.*, 1985). Le promoteur du TNF- α possède des sites de fixation pour différents facteurs de transcription, principalement NF- κ B et AP-1, mais aussi AP-2, NF-AT (nuclear factor of activated T cell), CRE (cyclic adenosine monophosphate response element) (Kuprash *et al.*, 1999 ; Yao *et al.*, 1997). Ces différents facteurs de transcription peuvent interagir de façon différente selon le type de stimulus et le type de cellule stimulée. Le polymorphisme du promoteur du TNF- α influence les capacités individuelles de synthèse du TNF- α , et donc potentiellement la susceptibilité aux maladies inflammatoires (production élevée de TNF- α) et aux risques d'infections (faible production de TNF- α) (Huang *et al.*, 1997). Le gène du TNF- α est un gène de la réponse immédiate ; les niveaux d'ARNm augmentent brusquement en 15 à 30 minutes après une stimulation. Le précurseur du TNF- α est une protéine transmembranaire de 26 kDa, avec une extrémité C-terminale externe à la cellule et un domaine cytoplasmique. Cette protéine peut être clivée par une métalloprotéase membranaire appelée TNF convertase enzyme (TACE) (Gearing *et al.*, 1994). Le TNF- α ainsi libéré (17 kDa) peut s'assembler en trimère circulant (Aggarwal *et al.*, 1985). Le TNF- α peut donc exercer sa fonction, soit à distance par la forme soluble, soit lors de contact intercellulaire par la forme membranaire (Kriegler *et al.*, 1988).

1.2. Sources et inducteurs

De nombreuses cellules produisent le TNF- α . Les monocytes et les macrophages sont les principales sources de TNF- α , mais les cellules dendritiques, les lymphocytes T et B, les cellules natural killer (NK), les PNN, les mastocytes et les fibroblastes en synthétisent également (Bazzoni and Beutler., 1996). L'expression du gène du TNF- α est stimulée par une large variété d'agents physiques, chimiques et biologiques. Les facteurs bactériens sont de puissants inducteurs du TNF- α . Les lipopolysaccharides (LPS) de la paroi des bactéries à Gram négatif sont les plus puissants stimuli de la biosynthèse du TNF- α par les monocytes et les cellules dendritiques. Le LPS induit cette synthèse par interaction avec le complexe récepteur CD14/TLR4 (Gangloff *et al.*, 2005) présent à la surface des monocytes et des cellules dendritiques.

1.3. Activités biologiques

Le TNF- α exerce de nombreuses activités biologiques, notamment dans la physiologie du développement embryonnaire (Wride and Sanders., 1995) et dans la régulation du sommeil (Krueger *et al.*, 1998) mais son rôle principal est d'assurer la défense anti-infectieuse de l'organisme (Beutler., 1999). Le rôle du TNF- α dans l'inflammation est crucial. Il favorise le chimiotactisme des macrophages et des PNN en augmentant le niveau d'expression des chimiokines (MCP-1, IL-8,...) (Hachicha *et al.*, 1993 ; Rathanaswami *et al.*, 1993) et des molécules d'adhésions (ICAM-1, VCAM-1, sélectines) à la surface des ces populations cellulaires (Iademarco et al., 1995 ; Weller et al., 1992). Le TNF- α induit la libération de molécules de la défense immédiate (radicaux libres, monoxyde d'azote, métalloprotéases, PGE2, PAF) par les neutrophiles et les cellules endothéliales (Sakurai *et al.*, 1995 ; Zhang *et al.*, 1998). Ces médiateurs modulent les phénomènes primaires de l'inflammation comme la vasodilatation, la perméabilité, le chimiotactisme, et favorisent les mécanismes de destructions tissulaires. Le TNF- α active la transcription de différentes cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6,...) et de facteurs de croissance (GM-CSF) pour amplifier la réponse inflammatoire.

Le TNF- α intervient aussi dans la genèse de la réponse immune spécifique. Il favorise en association avec le GM-CSF la maturation des cellules dendritiques (Caux *et al.*, 1992) et contrôle directement et indirectement, par l'intermédiaire d'autres cytokines, la prolifération et la différenciation des lymphocytes T et B (Grech et al., 2000 ; Zuniga-Pflucker et al., 1995).

Le TNF- α induit également la production de protéases dans différents types cellulaires et notamment la synthèse de MMP-2 et MMP-9 par les fibroblastes (Siwik *et al.*, 2000) et augmente l'activité élastolytique des cellules endothéliales (Toborek and Hennig., 1993).

2. L'interleukine-1 α (IL-1 α)

2.1. Structure du gène et de la protéine

Le gène de l'IL-1 α humaine est localisé sur le bras long du chromosome 2 (Webb *et al.*, 1986). Les régions régulatrices du promoteur du gène sont dispersées sur plusieurs milliers de paires de bases en amont du site de départ de la transcription. De nombreux sites de fixation pour différents facteurs de transcription sont présents dans ces régions, notamment NF- κ B et NF-IL6 présents dans la partie proximale du promoteur (Hunninghake *et al.*, 1992 ; Zhang and Rom, 1993). Le promoteur du gène possède également un site AP-1, un site NF- κ B (Hiscott *et al.*, 1993) et deux sites NF- κ B-like dans les régions plus distales (Goto *et al.*, 1999). Dans les monocytes humains, le niveau d'expression des ARNm de l'IL-1 α augmente très rapidement, dans les 15 minutes suivant la stimulation et reste stable au moins pendant 4 heures (Fenton *et al.*, 1988).

La protéine IL-1 α est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 31 kDa (pro-IL-1 α) qui ne possède pas de peptide signal. En conséquence, et contrairement à la plupart des autres cytokines, l'IL-1 α est abondamment stockée dans le cytoplasme (Cavaillon and Haeflner-Cavaillon., 1990). La production d'IL-1 α mature (17 kDa) nécessite une modification post-traductionnelle qui consiste en un clivage de la pro-IL-1 α sous l'action de deux enzymes : l'*IL-1 α converting enzyme* (ICE ou caspase-1) (Howard *et al.*, 1991) et la caspase-5 (Martinon *et al.*, 2002). L'IL-1 α peut cependant être sécrétée sous sa pro-forme (Beuscher *et al.*, 1990) et être clivée par d'autres enzymes comme l'élastase leucocytaire (Black *et al.*, 1988) ou des MMPs (Schonbeck *et al.*, 1998) présentes au niveau du site inflammatoire.

2.2. Sources et inducteurs

La plupart des agents pathogènes et leurs produits (endotoxines bactériennes par exemple) sont capables de stimuler la synthèse d'IL-1 α . De nombreux produits non microbiens sont également capables d'induire la production de cette cytokine. C'est le cas par exemple de certains produits de la MEC comme la fibronectine (Graves and Roman., 1996), le collagène de type I (Pacifi *et al.*, 1991) et la laminine (Roman *et al.*, 1999).

L'IL-1 α est essentiellement produite par les monocytes et les macrophages stimulés, les PNN, et, dans une moindre mesure, par les lymphocytes B et T, les fibroblastes ou encore les cellules endothéliales (Dinarello., 1988).

2.3. Activités biologiques

L'IL-1 α est une cytokine pléiotrope comme le TNF- α , ce qui explique un fort recoupement de leurs spectres d'activité. L'IL-1 α stimule les monocytes et les lymphocytes T et active le niveau d'expression de molécules d'adhésion au niveau de l'endothélium vasculaire (Lidington *et al.*, 1998). Les Lymphocytes B sont également sensibles à l'IL-1 α qui entraîne leur maturation et agit en synergie avec d'autres cytokines pour stimuler leur prolifération (Dinarello., 1994). En synergie avec l'IL-6, l'IL-1 α agit sur les hépatocytes et active la synthèse de protéines de l'inflammation, et en particulier de la protéine C réactive (CRP), de l' α 1-antitrypsine et de l' α 2-macroglobuline, ainsi que de lectines comme la protéine de liaison du mannane (MBP) et la protéine de liaison des LPS (LBP) (Dinarello *et al.*, 1986 ; Moshage *et al.*, 1988). L'IL-1 α entraîne la production de protéases dans différents types cellulaires et notamment la synthèse de MMP-2 et MMP-9 par les fibroblastes (Siwik *et al.*, 2000).

3. L'interleukine-6 (IL-6)

3.1. Structure du gène et de la protéine

Le gène de l'IL-6 se situe sur le chromosome 7 humain (7p21) et a une longueur d'environ 5 kb. Il est constitué de 5 exons. De nombreux sites de régulation de la transcription, dont NF- κ B qui est indispensable à la transmission du signal induit par le LPS, ont été identifiés en amont du gène de l'IL-6 (Dendorfer *et al.*, 1994). L'IL-6 humaine est une glycoprotéine de 26 kDa (184 acides aminés). Le précurseur de l'IL-6 est constitué de 212 acides aminés, dont un peptide signal de 28 acides aminés (Hirano *et al.*, 1986). De nombreuses modifications post-traductionnelles dont des N- et O-glycosylations, ainsi que des phosphorylations expliquent l'hétérogénéité des poids moléculaires de l'IL-6 purifiée (21 à 28 kDa) (Van Snick., 1990).

3.2. Sources et inducteurs

L'IL-6 est produite par de nombreux types cellulaires comprenant des cellules immunitaires comme les monocytes, les macrophages et les lymphocytes B et T ainsi que des cellules non immunitaires comme les kératinocytes, les fibroblastes, et les cellules

endothéliales (Kishimoto., 1989). La production d'IL-6 est régulée par de nombreux signaux qui diffèrent en fonction du type cellulaire. Ainsi, le LPS stimule la production d'IL-6 par les monocytes et les fibroblastes (Helfgott *et al.*, 1987) alors que la production d'IL-6 par les kératinocytes est activée par le TNF- α et l'IL-1 α (Ansel *et al.*, 1990).

3.3. Activités biologiques

L'IL-6 est une cytokine à activité pléiotrope dont le rôle au cours de l'inflammation est parfois l'objet de controverses.

L'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire pyrogène qui induit la production de la plupart des protéines de l'inflammation aiguë (Gauldie *et al.*, 1987). En association avec son récepteur soluble, l'IL-6 dirige la transition de la phase aiguë en phase chronique de l'inflammation en modifiant la nature de l'infiltrat cellulaire : remplacement progressif des PNN par les monocytes (Kaplanski *et al.*, 2003). Au cours de la phase chronique de l'inflammation, l'IL-6 est nécessaire à la différenciation terminale des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'immunoglobulines (Hirano *et al.*, 1986). L'IL-6 est également un facteur d'activation des lymphocytes T (LT) (Le *et al.*, 1989) et elle potentialise l'effet de l'IL-2 en augmentant le niveau d'expression du récepteur à l'IL-2 à la surface des LT activés (Noma *et al.*, 1987).

Certaines études montrent que l'IL-6 peut également exercer un rôle anti-inflammatoire en contrôlant le niveau de production de cytokines pro-inflammatoires (Xing *et al.*, 1998). Par ailleurs, l'IL-6 stimule la production de l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra) qui est un médiateur à activité anti-inflammatoire (Gabay *et al.*, 1997).

4. L'interkine-10 (IL-10)

4.1. Structure du gène et de la protéine

Le gène de l'IL-10 humaine est localisé sur le chromosome 1 et comprend quatre exons (de Waal *et al.*, 1992). Des séquences de contrôle de la transcription ont été identifiées dans des régions non codantes du gène de l'IL-10 qui présentent une certaine homologie avec des séquences du gène de l'IL-6 (Moore *et al.*, 1993). Le principal facteur de transcription impliqué dans la régulation de ce gène est le facteur Sp1 (Brightbill *et al.*, 2000). Le promoteur de l'IL-10 possède également des sites de fixation pour d'autres facteurs de transcription comme NF- κ B, C/EBP ou AP-1 mais, à la différence des promoteurs des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires, ces facteurs de transcription ne sont pas nécessaires à l'activation de la synthèse de l'IL-10 (Bondeson *et al.*, 1999 ; Kim *et al.*, 1992).

Le gène de l'IL-10 code pour un polypeptide de 160 acides aminés contenant une séquence signal hydrophobe de 18 résidus. Cette protéine est un homodimère de 37 kDa faisant partie de la famille des cytokines en hélice-à de classe II (Walter., 2004)

4.2. Sources et inducteurs

L'IL-10 est produite par certains clones de lymphocytes T comme les LT régulateurs (LTreg), les lymphocytes Th-1, Th-2, les LT cytotoxiques activés, mais également par les cellules NK et les lymphocytes B. Si les lymphocytes sont les principales cellules capables de produire de l'IL-10, de nombreux autres types cellulaires peuvent produire cette cytokine. C'est le cas notamment des cellules présentatrices d'Ag (CPA) (monocytes/macrophages et cellules dendritiques) en réponse à une activation par un antigène comme le LPS (Akbari et al., 2001 ; Yssel et al., 1992). Le TNF- α est également capable d'induire la production de cette cytokine par les monocytes. La synthèse de l'ARNm de l'IL-10 dans les monocytes activés commence tardivement, plus de 10 heures après la stimulation. Par ailleurs, le maximum de production de l'IL-10 est observé plus de 24 heures après une activation alors que le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-1 β sont sécrétés entre 4 et 8 heures après le stimulus activateur (de Waal et al., 1991).

4.3. Activités biologiques

L'IL-10 inhibe de multiples fonctions des monocytes/macrophages et des cellules dendritiques (CD). En effet, L'IL-10 diminue le niveau d'expression des molécules de classe II du CMH et des molécules de costimulation CD80 et CD86 à la surface des macrophages et des CD, ce qui réduit leur capacité de présentation de l'Ag (Ding et al., 1993 ; Kubin et al., 1994 ; Mitra et al., 1995). Par ailleurs, cette cytokine inhibe la synthèse de cytokines pro-inflammatoires par les CPA, et en particulier de l'IL-12 (Macatonia et al., 1993), de l'IL-1 β , de l'IL-6 et du TNF- α (Fiorentino et al., 1991). Par ailleurs, elle exerce dans certaines conditions un rétrocontrôle négatif de sa propre production (de Waal et al., 1991). Au niveau des CD, l'IL-10 limite le développement des réactions allogéniques T (Groux et al., 1996) et entraîne des phénomènes d'anergie (Steinbrink et al., 1999b). C'est également au travers de la production de cette cytokine que les CD peuvent induire la différenciation des lymphocytes T vers un profil de LTreg (Akbari et al., 2001). De plus, l'addition d'IL-10 lors de la différenciation des DC inhibe la maturation des CD (Allavena et al., 1998). C'est également par le biais de l'IL-10 que les lymphocytes Th-2 régulent négativement les cellules Th-1 via

l'inhibition de la synthèse de l'IFN- γ et de l'IL-2 par les cellules Th-1 (Fiorentino *et al.*, 1989). Au niveau des lymphocytes T CD8⁺, l'IL-10 exerce une activité activatrice en induisant leur recrutement, en augmentant leur activité cytotoxique et leur prolifération.

5. L'interleukine-12 (IL-12)

5.1. Structure du gène et de la protéine

L'IL-12 est une glycoprotéine hétérodimérique de 70 kDa constituée de deux sous-unités de 35 kDa (p35) et de 40 kDa (p40) reliées par un pont disulfure (Kobayashi *et al.*, 1989). Ces protéines sont codées par deux gènes différents, localisés sur le chromosome 3 pour la sous-unité p35 et sur le chromosome 5 pour la sous-unité p40. L'expression des deux sous-unités est régulée de façon indépendante. Lorsqu'elles sont exprimées dans la même cellule, ces sous-unités forment une protéine p70 active (Gately *et al.*, 1991). Chez l'Homme, le gène p40 est fortement inductible et son promoteur p40 fixe de nombreux facteurs de transcription tels que NF- κ B, IRF-1 et c-rel (Ma *et al.*, 1996 ; Murphy *et al.*, 1995). A l'inverse de l'IL-12p40, la p35 est exprimée de façon constitutive mais cette protéine n'est jamais sécrétée sous forme d'un homodimère (Babik *et al.*, 1999). Les protéines p35 et p40 forment aussi des hétérodimères avec d'autres protéines aboutissant à la production de deux autres cytokines de la famille de l'IL-12, l'IL-27 et l'IL-23 (Oppmann *et al.*, 2000 ; Pflanz *et al.*, 2002).

5.2. Source et inducteurs

L'IL-12 est principalement produite par les monocytes/macrophages (Kato *et al.*, 1996), les PNN (Cassatella *et al.*, 1995) et les CD (Trinchieri., 2003). Au niveau des CD, deux mécanismes différents sont impliqués dans la production de l'IL-12. Le premier mécanisme est lié à la stimulation des CPA par les microorganismes et/ou leurs produits (LPS bactériens par exemple) (Dalpke *et al.*, 2002 ; Ma *et al.*, 2005). Le second mécanisme inducteur de l'IL-12 est lié à la liaison CD40/CD40L mise en jeu au cours de l'interaction CD/Lymphocyte T (Shu *et al.*, 1995).

L'IL-12 est également régulée par d'autres cytokines inflammatoires. Ainsi, le TNF- α et l'IFN- γ potentialisent la production de l'IL-12 alors que l'IL-10, l'IL-4 et le TGF- β inhibent sa synthèse (Flesch *et al.*, 1995 ; Yun *et al.*, 2002 ; Zhou *et al.*, 2003).

5.3. Activités biologiques

Le rôle majeur de l'IL-12 concerne l'orientation de la réponse immunitaire spécifique vers un profil de type Th-1 pro-inflammatoire, ce qui est décrit chez l'homme et chez la souris (Marshall *et al.*, 1995 ; Sypek *et al.*, 1993). Lorsqu'un lymphocyte T naïf rencontre un Ag présenté par une CD, l'IL-12 permet d'induire sa différenciation en cellule Th-1 caractérisée par une forte production d'IFN- γ (Wu *et al.*, 1993). Par ailleurs, l'IL-12 et l'IFN- γ , semblent agir de façon synergique puisque l'IFN- γ contrôle la synthèse d'IL-12 de manière positive formant ainsi une boucle amplificatrice de régulation (Morris *et al.*, 1994). A l'inverse, l'IL-12 inhibe la différenciation des LT vers un profil Th-2. L'IL-12 augmente également le chimiotactisme et la migration transendothéliale des Lymphocytes T en stimulant l'expression du récepteur de chimiokine CCR5 à leur surface (Iwasaki *et al.*, 2001).

Les actions pro-inflammatoires de l'IL-12 en font une cytokine néfaste dans certaines pathologies inflammatoires chroniques. Ainsi, la présence de CD sécrétrices d'IL-12 dans les plaques d'athéromes conduit à une accumulation de lymphocytes T de type Th-1 qui contribuent à l'entretien de la pathologie artérielle (Zhang *et al.*, 2006).

Chapitre 3 : Les cellules dendritiques et la tolérance immunologique

Une des propriétés remarquables du système immunitaire repose sur la capacité de ce dernier à reconnaître et à éliminer les antigènes étrangers et à ne pas réagir contre les antigènes du Soi. A l'état physiologique, la tolérance au Soi est une caractéristique essentielle du système immunitaire qui assure le maintien de l'homéostasie immunologique et la prévention des maladies auto-immunes. Pour induire la tolérance, le système immunitaire utilise différents mécanismes, tant au niveau central (tolérance thymique) qu'au niveau périphérique. Les cellules dendritiques sont des cellules clés des réponses immunitaires car elles ont la capacité à moduler la balance entre l'immunité et la tolérance en fonction des informations fournies par le microenvironnement cellulaire (Banchereau *et al.*, 2000).

A. Les Cellules Dendritiques

1. Généralités

Les cellules dendritiques (CD) ont été décrites pour la première fois en 1968 dans l'épiderme et identifiées sous le nom de cellules de Langerhans (LC). Ce n'est qu'en 1973 que ces cellules ont été décrites dans d'autres tissus. En effet, ces cellules colonisent les organes périphériques comme l'épithélium intestinal ou encore l'épithélium bronchique (Steinman and Cohn., 1973). Les CD constituent une population hétérogène de cellules d'origine hématopoïétique. Ces cellules interviennent à différents niveaux dans le système immunitaire et en particulier dans l'initiation et la régulation de la réponse immune innée et adaptative, dans la genèse des mécanismes de tolérance centrale au niveau du thymus, et également dans l'entretien des mécanismes de tolérance périphérique. Ces fonctions diverses et parfois opposées sont exercées par différentes sous-populations de CD qui se distinguent sur des bases phénotypiques, morphologiques, fonctionnelles, ontogéniques et/ou anatomiques.

Les CD constituent le lien entre la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire acquise. Elles ont la capacité à répondre rapidement à l'agression par un agent pathogène et à stimuler les cellules de l'immunité innée puis à initier une réponse immune spécifique de l'agent pathogène. Les CD ont un rôle clé dans la réponse immunitaire grâce aux interactions qu'elles sont capables d'établir avec les principaux effecteurs de l'immunité innée et adaptative (monocytes, lymphocytes T et B, cellules NK) (Banchereau *et al.*, 2000 ; Steinman

and Nussenzweig., 2002). Elles sont également essentielles au sein du système immunitaire par leur capacité à présenter des Ag étrangers à des lymphocytes T naïfs pour permettre la mise en place d'une mémoire immunologique.

Les deux sous-populations de CD que l'on distingue par leur origine sont les CD myéloïdes (LC et CD interstitielles) et les CD lymphoïdes (CD plasmacytoïdes). Ces cellules sont caractérisées par l'évolution de leur phénotype et par leurs aptitudes à capturer l'Ag. Les CD présentent 3 stades de développement ou l'on distingue, *i)* les précurseurs des CD qui circulent dans les vaisseaux lymphatiques et sanguins et qui colonisent les tissus périphériques, *ii)* les CD immatures, localisées au niveau des muqueuses, et caractérisées par des propriétés de capture de l'Ag associées à une faible capacité de présentation de cet Ag aux lymphocytes T, *iii)* les CD matures, présentes au sein des ganglions lymphatiques, et douées de propriétés de présentation des peptides antigéniques aux lymphocytes T.

2. Ontogenèse des cellules dendritiques (schéma 10)

Il existe deux grandes familles de CD chez l'homme, les CD myéloïdes (nommées CD1) qui sont les plus anciennement connues et qui orientent la réponse immune vers la production de cytokines de type 1 (IFN- α et TNF- α principalement), et, les CD plasmacytoïdes (nommées CD lymphoïdes ou CD2) qui orientent la réponse immune vers la production de cytokines de type 2 (IL-4 et IL-5) et pour lesquelles une origine lymphoïde est souvent évoquée dans la littérature. Toutes les populations de CD dérivent de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes CD34⁺. Ces cellules souches se trouvent dans la moelle osseuse, mais également dans le sang de cordon et en faible quantité dans le sang périphérique (Caux et al., 1992 ; de Fraissinette et al., 1988 ; Reid et al., 1990).

2.1. Les CD myéloïdes (CDm)

La différenciation des CD à partir de progéniteurs CD34⁺ révèle deux voies myéloïdes indépendantes qui passent par deux précurseurs différents. Les deux précurseurs de CD myéloïdes (pré-CD1) expriment le CD11c contrairement au précurseur des CD plasmacytoïdes (Banchereau *et al.*, 2000). Ces 2 précurseurs se différencient sur la base de l'expression du CD14 et du CD1a (Caux *et al.*, 1996). Le précurseur CD11c⁺ CD14⁻ CD1a^{+fort} se différencie en cellules de Langerhans, et, le précurseur CD11c⁺ CD14⁺ CD1a^{-/+faible} se différencie en CD interstitielles.

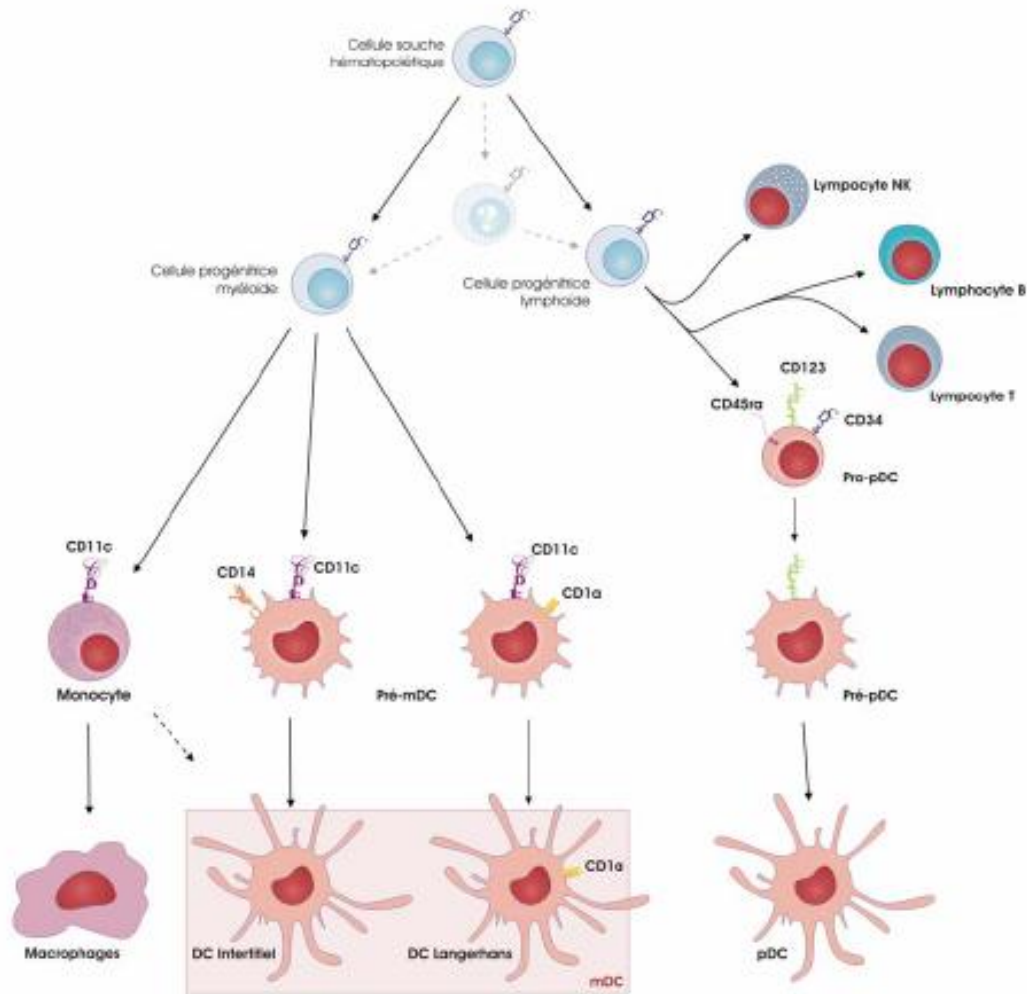


Schéma 10 : Ontogénie des cellules dendritiques
(Banchereau, 2000).

2.2. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (CDp)

Les CDp possèdent des caractéristiques qui les distinguent des CDm. Ainsi, les cytokines nécessaires à leur développement, leur phénotype, leur capacité à répondre aux agents pathogènes (expression particulière de PRRs), leur capacité migratoire et leurs fonctions effectrices les différencient des CDm.

Les CDp sont présentes à différents stades de maturation dans les zones T des ganglions normaux, réactionnels ou pathologiques (Banchereau *et al.*, 2000), dans le sang périphérique et la moelle osseuse (Blom *et al.*, 2000 ; Grouard *et al.*, 1997), dans le sang placentaire (Sorg *et al.*, 1999) et au niveau du thymus. Au niveau thymique, les CD qui participent à la sélection négative des lymphocytes T autoréactifs semblent être rattachées à la sous-population des CDp (Bendriss-Vermare *et al.*, 2001). Les CDp expriment de nombreux marqueurs lymphoïdes comme le CD4 et le CD45RA ainsi que les ARNm des pré-TCR (Res

et al., 1999 ; Spits *et al.*, 2000). Ces cellules ont une forte capacité à produire les IFN- γ et β (Grouard *et al.*, 1997 ; Rissoan *et al.*, 1999) et répondent à des stimuli viraux ou microbiens en produisant des IFN de classe I et/ou de l'IL-12. Cultivées en présence d'IL-3 et de CD154, ou avec des stimuli microbiens tels que des oligonucléotides CpG bactériens, les CDp acquièrent un phénotype et des caractéristiques de CD matures.

3. Les cellules dendritiques dérivées des monocytes

Les monocytes (CD14⁺ CD11c⁺ CD1a⁻) représentent aussi des cellules myéloïdes capables de se transformer *in vitro* en CDM (Mo-CD) en présence de GM-CSF et d'IL-4 (Zhou and Tedder., 1996). Plusieurs arguments laissent supposer que la différenciation de monocytes en CD survient également *in vivo*, sous l'influence de cytokines produites localement au niveau d'un site inflammatoire. Ainsi, les Mo-CD représenteraient une voie supplémentaire mise en place dans un contexte particulier pour répondre à un besoin précis (Osugi *et al.*, 2002). Une population de monocytes HLA-DR⁺ CD4⁺ CD14^{+faible} CD16⁺ possédant des caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques différentes des monocytes classiques CD14⁺ CD16⁻ a été identifiée dans la circulation sanguine comme une nouvelle sous-population de CDM (Almeida *et al.*, 2001). De même, des monocytes CD14⁺ CD2⁺ qui, après culture en présence de GM-CSF et d'IL-4, génèrent des CDM possédant des capacités allostimulatrices bien supérieures à celle des CDM générées à partir de monocytes CD14⁺ CD2⁻ ont été découverts dans la circulation sanguine (Crawford *et al.*, 1999).

Les Mo-CD ont un phénotype immature, c'est-à-dire qu'elles expriment faiblement les molécules de co-stimulation CD80 et CD86, les molécules du CMH de classe II et les récepteurs aux chimiokines associées à l'inflammation (CCR1, CCR2 et CCR5). Les Mo-CD ont une grande capacité de capture de l'Ag associée à une faible capacité de présentation des peptides antigéniques aux lymphocytes T (Bell *et al.*, 1999). La maturation des Mo-CD est obtenue avec des Ag bactériens, comme le LPS, ou avec des cytokines comme le TNF- α ou l'IL-1 α (Caux *et al.*, 1992 ; Palucka *et al.*, 1998).

4. Caractéristiques fonctionnelles des cellules dendritiques

En réponse à différents stimuli comme des agents pathogènes (lipopolysaccharides bactériens, ADN bactériens,...), ou des signaux pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1, certaines chimiokines), les cellules dendritiques immatures migrent vers les organes lymphoïdes secondaires grâce à l'expression de récepteurs aux chimiokines inflammatoires et à certaines molécules d'adhérence. Le processus de maturation fait passer de l'état de cellule immature,

capable de capturer les Ag, à celui de cellule mature capable de présenter le complexe CMH-peptide aux cellules de l'immunité acquise. Cette maturation est un processus continu qui commence, dans les tissus périphériques, par la capture de l'Ag, qui se poursuit tout au long de la migration jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires, et qui se termine lors de l'interaction avec les LT.

4.1. Capture de l'Antigène

Les CD immatures jouent un rôle de sentinelle au cours d'une agression du fait de leur localisation stratégique aux portes d'entrée de l'organisme (Banchereau and Steinman., 1998). Dans la plupart des tissus périphériques, elles possèdent des capacités maximales de reconnaissance des Ag (via de nombreux PRRs), et sont très efficaces pour la prise en charge des Ag par différentes voies d'internalisation (Jiang et al., 1995 ; Reis e Sousa et al., 1993 ; Sallusto et al., 1995). Ces voies impliquent *i)* la macropinocytose (mise en jeu des aquaporines), *ii)* l'endocytose par l'intermédiaire de récepteurs type lectine C qui reconnaissent les Ag glycosylés (récepteurs au mannose, DEC 205) ou les récepteurs du fragment Fc α des immunoglobulines (CD64, CD32), *iii)* la phagocytose de particules, de corps apoptotiques ou nécrotiques, de virus, ou de bactéries.

4.2. Maturation des cellules dendritiques et apprêtement de l'Ag

Une maturation partielle de la CD s'opère après capture d'un Ag. La CD devient alors réfractaire à toute nouvelle stimulation antigénique. D'autres signaux sont alors requis pour obtenir une maturation complète de la CD. Ces signaux peuvent être d'origine microbienne (exposition à des PAMP conduisant à l'activation des TLR), peuvent être des cytokines (TNF- α ou l'IL-6 par exemple) ou encore des interactions cellulaires.

Au cours de l'étape de maturation, la CD apprête l'Ag pour pouvoir le présenter aux lymphocytes T. La présentation d'un peptide antigénique fait intervenir principalement les molécules de classe II du CMH (CMH-II), mais les molécules de classe I du CMH (CMH-I) peuvent dans certaines conditions participer aux mécanismes de présentation. Les molécules du CMH de classe II, comme les molécules HLA-DM ou HLA-DR, sont mobilisées pour la présentation, aux lymphocytes T CD4⁺, de peptides antigéniques d'origine exogène présents dans les endosomes. Une forte expression de ces molécules de classe II est restreinte aux CPA comme les macrophages, les CD, et les lymphocytes B. En revanche, certains Ag d'origine endogène ou virale sont dégradés dans le protéasome (Banchereau *et al.*, 2000) puis associés aux molécules du CMH-I (Norbury *et al.*, 1997). Les complexes Ag/CMH-I sont présentés

aux lymphocytes T CD8⁺, qui jouent un rôle majeur dans le développement d'une réponse cytotoxique vis-à-vis d'une infection virale ou d'un processus tumoral (Watts., 1997 ; Yewdell *et al.*, 1999).

D'autres voies de présentation antigénique existent au niveau des CD, notamment celles faisant intervenir la famille des CD1 lors de la présentation d'antigènes contenant des lipides ou des glycolipides bactériens (Burdin and Kronenberg., 1999).

La maturation des CD s'accompagne aussi de changements phénotypiques conduisant à *i)* une augmentation de l'expression de molécules d'adhérence participant à l'établissement de la synapse immunologique (Santin *et al.*, 1999), *ii)* une augmentation de l'expression des molécules co-stimulatrices (CD40, CD80 et CD86) nécessaires à l'activation des lymphocytes T (Santin *et al.*, 1999), *iii)* l'apparition du marqueur de surface CD83 spécifique de la maturation des CD (Zhou and Tedder., 1996), et *iv)* l'apparition du récepteur CCR7 qui permet aux CD de quitter l'interface épithéliale pour gagner les organes lymphoïdes secondaires, via les vaisseaux lymphatiques qui expriment les ligands CCL19, et CCL21 (Sozzani *et al.*, 1998).

4.3. Migration des cellules dendritiques et réseau des chimiokines

Les CD possèdent de fortes capacités migratoires qui varient en fonction de leur stade de maturation. La migration sélective des CD de la moelle osseuse vers les tissus périphériques puis vers les organes lymphoïdes secondaires est fortement régulée et dépend de l'expression de molécules d'adhérence (sélectines et intégrines) et de l'expression différentielle de récepteurs de chimiokines (Caux *et al.*, 2002). Ainsi, le recrutement des précurseurs des CD vers les sites inflammatoires est contrôlé par l'action de différentes chimiokines ; dans un premier temps, les CD circulantes exprimant le récepteur de chimiokines CCR2 (CD CCR2⁺) sont mobilisées du sang vers les tissus par l'expression de la chimiokine MCP-4/CCL13 sécrétée par les fibroblastes ou les cellules endothéliales (Vanbervliet *et al.*, 2002). Les CD migrent ensuite vers le site inflammatoire en réponse à la production de chimiokines inflammatoires telles que MIP-3 α , RANTES, SDF-1 et MDC par les cellules épithéliales, concomitante à l'augmentation de l'expression de récepteurs à ces chimiokines (CCR6, CCR1, CXCR4, CCR4) à la surface des CD (Caux *et al.*, 2000). Cette première phase de migration se termine lorsque la CD capture un Ag, ce qui induit la maturation et un changement de profil migratoire permettant aux CD de quitter les tissus et de gagner les organes lymphoïdes secondaires. Au niveau des récepteurs de chimiokines, la maturation se traduit par la perte de la sensibilité des CD aux cytokines inflammatoires précédemment

citées et par l'acquisition du récepteur de surface CCR7 qui est absent de la surface des CD immatures (Sallusto *et al.*, 1998 ; Sozzani *et al.*, 1998). La chimiokine CCL21 (ligand du CCR7) qui est synthétisée par les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques, permet la migration des CD à travers les vaisseaux. Les CD gagnent ainsi les ganglions de drainage de la zone inflammatoire et se localisent dans les zones T paracorticales (Cyster., 1999).

Certains produits de dégradation de protéines de la matrice extracellulaire tels que l'ostéopontine (Weiss *et al.*, 2001) ou l'acide hyaluronique (Mummert *et al.*, 2002) exercent des activités chimioattractantes vis-à-vis des CD.

4.4. Activation des LT par les CD : mise en jeu de la synapse immunologique

L'activation des lymphocytes T nécessite l'interaction entre le récepteur des cellules T (TCR) et le complexe CMH/Ag au sein d'une synapse immunologique qui se forme entre les LT et les CD. L'établissement de la synapse immunologique est un phénomène dynamique complexe, qui n'est pas totalement élucidé, et qui fait intervenir différents processus comme des mouvements ioniques, des modifications du cytosquelette des CD, des interactions physiques directes, et l'intervention de cytokines et de chimiokines (Dustin., 2006). La synapse se forme dans la zone de contact entre les membranes plasmiques des deux cellules, zone où se concentrent des molécules d'adhésion, des molécules du CMH et des molécules de co-stimulation (Schéma 11).

La formation de la synapse est initiée par l'interaction entre les molécules LFA-1 et ICAM 2/3 exprimées à la surface du LT et les molécules ICAM-1 (CD54) et DC-SIGN (CD209) exprimées sur la CD mature. D'autres molécules telles que les molécules CD4 et CD8 et des molécules de co-stimulation sont ensuite recrutées au niveau de la synapse immunologique pour renforcer le dialogue entre la CD et le lymphocyte T (Krummel *et al.*, 2000). L'engagement de quelques TCR initie un premier signal conduisant à des modifications du cytosquelette, à la redistribution des autres TCR et à la relocalisation, à proximité des TCR, des molécules de co-stimulation B7. Ces molécules de co-stimulation interagissent avec les molécules CD28 et CTLA-4 portées par les lymphocytes T. L'engagement de CD28 augmente de l'expression du gène de l'IL-2 (Fraser *et al.*, 1991) et du gène anti-apoptotique Bcl-XL protégeant les cellules T du signal apoptotique conféré par l'engagement du TCR (Boise *et al.*, 1995). D'autres molécules de co-stimulation participent au dialogue CD-lymphocytes T. Ainsi, les interactions CD40/CD40-ligand sont aussi impliquées dans la genèse de signaux co-activateurs. La molécule CD40 est exprimée à la surface des CD et son ligand naturel est la molécule CD154 ou CD40-ligand exprimée par les lymphocytes T.

L'interaction CD40/CD40-ligand augmente la durée de vie des CD et entraîne leur maturation ultime (Ludewig *et al.*, 1995).

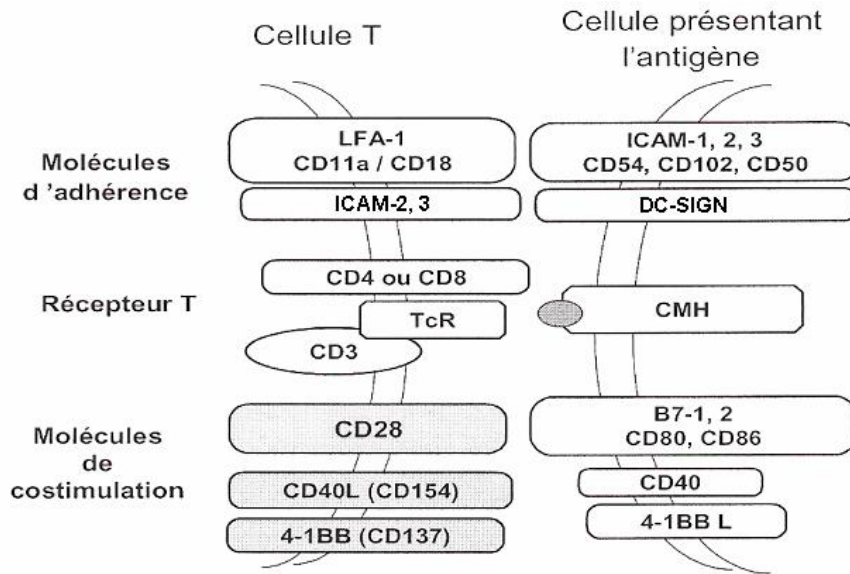


Schéma 11 : La synapse immunologique

(d'après www.theses.ulaval.ca/2004/21784/21784011.png, 2007).

B. La Tolérance immunologique

Physiologiquement, l'organisme met en place des mécanismes de tolérance au Soi évitant ainsi le développement d'une réponse immune contre ses propres constituants (auto-antigènes). Ce phénomène de tolérance du système immunitaire est impliqué dans le développement de pathologies auto-immunes, d'allergies, d'inflammations chroniques et de certaines tumeurs qui échappent au système immunitaire en induisant la tolérance vis à vis de leurs antigènes. Par ailleurs, la connaissance du fonctionnement de la tolérance est primordiale dans le cas d'une transplantation afin d'éviter les rejets de greffe (Li and Boussiotis., 2006 ; Morelli and Thomson., 2003)

1. Tolérance centrale

La tolérance centrale permet par sélection négative, d'induire la mort par apoptose de 90 à 99 % des thymocytes autoréactifs produits dans le thymus. Les clones autoréactifs possédant un récepteur T (TCR) à forte affinité pour les auto-antigènes présentés par les molécules du CMH des cellules dendritiques thymiques sont éliminés. Le phénomène de tolérance centrale réside donc principalement dans la mise en jeu de mécanismes de délétion des lymphocytes néo-formés auto-réactifs, mais il implique également la formation de lymphocytes T

régulateurs (Durkin and Waksman., 2001). Cependant, les mécanismes centraux (thymiques) ne peuvent expliquer totalement la tolérance au Soi et des mécanismes périphériques sont mis en place par l'organisme pour parer une tolérance centrale déficiente.

2. Tolérance périphérique

Les mécanismes de la tolérance périphérique permettent d'éliminer, hors du thymus, les éventuels clones auto-réactifs ayant échappé à la délétion intra-thymique, ou les clones dirigés contre des Ag du Soi absents dans le thymus. Différents Ag du Soi échappent à la tolérance centrale, c'est le cas pour certains Ag *i)* présents de façon transitoire (par exemple lors d'une grossesse), *ii)* exprimés tardivement dans la vie, ou *iii)* séquestrés dans les tissus ou les cellules et produits lors de la dégradation de ces tissus (par exemple les peptides de la MEC) ou lors de l'apoptose des cellules (Steinman *et al.*, 2003a).

Cinq mécanismes majeurs non exclusifs entre eux ont été proposés pour expliquer l'induction ou le maintien de la tolérance des LT : l'anergie clonale, la délétion clonale, l'ignorance immunologique, la déviation immune et la suppression active (Kamradt and Mitchison., 2001 ; van Parijs *et al.*, 1998) (figure 12).

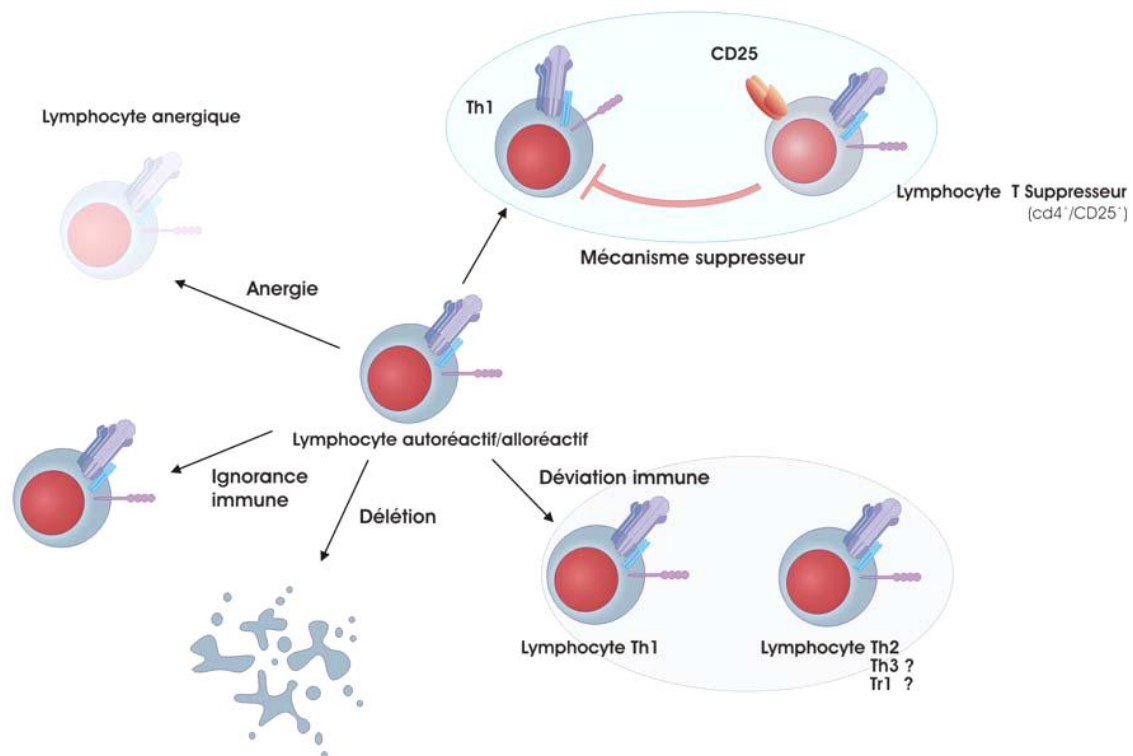


Schéma 12 : Les différents mécanismes de tolérance périphérique (Garnache-Ottou, 2004).

2.1. L'anergie clonale

Il s'agit d'un état de non-réponse spécifique des lymphocytes à un antigène. Les lymphocytes ne prolifèrent pas même s'ils sont stimulés dans des conditions optimales. L'anergie des LT est induite par les CPA, généralement après une stimulation antigénique incomplète, par exemple en l'absence du signal de co-stimulation. L'anergie clonale peut être définie comme une paralysie fonctionnelle des LT, caractérisée par une incapacité de production de cytokines et une incapacité à répondre à une nouvelle stimulation par ce même Ag (Falb *et al.*, 1996). Les LT anergiques sont cependant toujours capables de répondre aux cytokines produites par d'autres cellules. Il s'agit donc d'un état réversible et la tolérance est alors seulement temporaire (Fathman and Lineberry., 2007).

2.2. La délétion clonale

Il s'agit de l'élimination par apoptose des clones auto-réactifs. La délétion clonale implique l'induction de l'apoptose après activation du LT, principalement via la voie Fas-FasL (Suda *et al.*, 1993). Dans le cas de la délétion clonale, le clone T est détruit physiquement avec une efficacité d'induction de tolérance optimale, puisque les cellules réactives sont définitivement éliminées.

2.3. L'ignorance immunologique

L'ignorance immune correspond à l'absence de contact entre la CPA et le lymphocyte T qui aboutit à un phénotype naïf des LT. Certains antigènes sont présentés, par les CD, en quantité insuffisante et pendant un laps de temps trop court pour qu'une réponse spécifique des LT soit induite. Ces Ag périphériques sont donc ignorés par le système immunitaire (Zinkernagel and Hengartner., 2001).

2.4. La déviation immune

La déviation immune correspond à l'orientation de la réponse immune vers un profil de sécrétion de cytokines de type LT CD4⁺ helper-2 (Th-2) ou LTrégulateur au détriment du profil LT CD4⁺ Th-1. Les lymphocytes Th-2 sécrètent préférentiellement de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-10 qui inhibent *i)* la prolifération des NK et *ii)* la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages (Romagnani *et al.*, 1997). En revanche, les lymphocytes Th1 sécrètent de fortes quantités d'IFN γ , de TNF α et d'IL-2. Ces cytokines sont impliquées *i)* dans la coopération entre les lymphocytes T activés et les précurseurs des lymphocytes T

cytotoxiques, ii) dans l'activation des cellules NK et iii) dans l'amplification des fonctions des macrophages impliquées dans le développement des réponses immunitaires cytotoxiques et inflammatoires (D'Elia and Del Prete., 1998). La génération de LTh-2 au détriment des LTh-1 conduit donc à une diminution de la réponse inflammatoire et de la prolifération de LT cytotoxiques spécifiques d'un antigène. Ainsi, la réponse de type Th-2 est associée, dans la plupart des modèles expérimentaux d'allogreffe, à une absence de rejet à long terme de l'organe greffé (Arpinati *et al.*, 2000 ; Liu and Blom., 2000).

La déviation immune des Th-1 vers les LT régulateurs sera développée dans le chapitre suivant.

2.5. La suppression active : les lymphocytes T régulateurs/suppresseurs

Certaines populations de lymphocytes T CD4⁺ mais également de lymphocytes T CD8⁺ ont la capacité de réguler la réponse immune au travers de mécanismes dits de suppression active.

Le concept de lymphocytes T régulateurs/suppresseurs (LTreg), responsables du contrôle et de l'achèvement de la réponse immune, est apparu dans les années 1970. Différents modèles expérimentaux ont montré le rôle de LTreg dans l'induction de la tolérance aux antigènes du Soi (Groux *et al.*, 1997 ; Shevach *et al.*, 2001) et aussi dans l'induction de la tolérance aux allo-antigènes dans le cas de transplantation (Sakaguchi *et al.*, 2001).

Une dichotomie entre deux populations de LT CD4⁺ régulateurs peut être proposée en fonction de l'origine centrale ou périphérique de ces cellules et en fonction de la nature du mécanisme de suppression mis en jeu par ces cellules. La première population est représentée par les LTreg CD4⁺ CD25⁺. Ces LTreg sont produits dans le thymus au niveau de l'épithélium cortical (Jordan *et al.*, 2001). Ils exercent leur activité suppressive par l'intermédiaire de molécules exprimées à leur surface (CTLA-4, TGF- β membranaire) lors d'un contact cellulaire avec les lymphocytes T effecteurs (Suri-Payer *et al.*, 1998). La deuxième population de LT régulateurs est issue de la déviation immune des LT CD4⁺ conventionnels et constituent un stade alternatif de différenciation plutôt qu'une lignée cellulaire à part entière. Ces LTreg regroupent les LT Tr-1 (Levings and Roncarolo., 2000) et les lymphocytes Th-3 (Weiner., 2001). Leur mécanisme d'action fait intervenir des cytokines immunomodulatrices comme l'IL-10 et le TGF- α (Jonuleit *et al.*, 2003).

Les LTreg CD4⁺ CD25⁺, les LT Tr-1 ou Th-3 bloquent les fonctions effectrices des LT CD4⁺ et CD8⁺ conventionnels (Piccirillo and Shevach., 2001 ; Sakaguchi *et al.*, 2001).

3. Contrôle de la tolérance périphérique par les CD

Les CD, de part leur fonction de CPA et de production de cytokines, sont les principales actrices de la décision de déclencher une réponse immunitaire spécifique ou au contraire d'induire la tolérance des lymphocytes par rapport à un Ag (Steinman *et al.*, 2003b).

3.1. Tolérance et maturation des CD

La définition et la caractérisation des CD capables d'induire la tolérance restent, à ce jour, incomplètes. En effet, différents types de CD, d'origines et d'états de maturations distincts, peuvent posséder un rôle dans l'induction de la tolérance. Ainsi, les CD immatures de type myéloïdes et plasmacytoïdes ont été décrites comme pouvant induire la tolérance des cellules T (Jonuleit *et al.*, 2001 ; Martin *et al.*, 2002 ; Steinman *et al.*, 2003b). D'autres CD possédant des stades de maturation plus ou moins avancés sont retrouvées dans les organes lymphoïdes secondaires où elles ont la capacité d'induire la tolérance des LT (Henri *et al.*, 2001). De plus, certaines études semblent favoriser l'hypothèse de l'implication des CD matures, et non pas immatures, dans l'induction de la tolérance (Huang *et al.*, 2000 ; Scheinecker *et al.*, 2002).

Actuellement, la littérature met en avant le fait que certaines CD ont un état de maturation particulier, « semi-mature », dans le sens où elles ont la capacité de présenter un Ag à un lymphocyte mais sans posséder l'ensemble du répertoire immunologique nécessaire à l'induction d'une réponse immune spécifique. Ces CD « semi-matures » sont aussi appelées CD tolérogéniques (Reis e Sousa., 2006).

3.2. Induction de la tolérance par des CD tolérogéniques

Les CD tolérogéniques ont la capacité d'induire la tolérance des LT par différents mécanismes tels que l'absence du signal de co-stimulation, la présence de récepteurs inhibiteurs à leur surface, la dégradation du tryptophane ou la production de cytokines anti-inflammatoires.

3.2.1. Absence du signal de co-stimulation

Lorsqu'un LT naïf reconnaît un antigène par son TCR en absence des signaux de co-stimulation, il s'inactive et entre en état d'anergie (Gimmi *et al.*, 1993 ; Quarantino *et al.*, 2000). Les CD tolérogéniques expriment peu de molécules de co-stimulation et de CMH-II à leur surface (Janeway, Jr. and Medzhitov., 2002 ; Morelli and Thomson., 2003). Elles ont donc la capacité de présenter un Ag aux LT via le TCR mais elles induisent la tolérance des LT par manque de signaux de co-stimulation.

3.2.2. Les récepteurs inhibiteurs

L'absence des molécules de costimulation lors de l'interaction CD/lymphocytes est donc primordiale dans l'induction de la tolérance mais d'autres récepteurs, présents à la surface des CD tolérogéniques, possèdent également la capacité d'inhiber la prolifération des lymphocytes (Albert *et al.*, 2001). C'est le cas, par exemple, des récepteurs possédant le domaine cytoplasmique *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM) (Bolland and Ravetch., 1999). Certains récepteurs possédant un motif ITIM tels que l'*immunoglobulin-like transcript-3* (ILT-3) et l'ILT-4 sont exprimés à la surface des monocytes, des CD immatures et des CD tolérogéniques (Manavalan *et al.*, 2003). Ce domaine ITIM interfère avec la signalisation induite par l'interaction CD40/CD40L lors de la présentation antigénique par les CD (Colonna *et al.*, 1998 ; Colonna *et al.*, 1999) ce qui aboutit à l'inhibition de cette voie de signalisation et à l'anergie des LT CD4⁺ (Chang *et al.*, 2002).

Certains récepteurs de surface des CD dispensent des effets tolérogéniques lorsqu'ils sont clivés ou sécrétés. Ainsi, le CD83, un marqueur de maturation spécifique des CD, inhibe la maturation des CD et la prolifération des LT lorsqu'il est sécrété par ces mêmes CD (Lechmann *et al.*, 2002). De même, le CD25, qui est le récepteur de l'IL-2, présent à la surface des CD, peut être sécrété et ainsi séquestrer l'IL-2 ce qui conduit à une inhibition de la prolifération des LT (Chopra *et al.*, 1989 ; Bergwelt-Baildon *et al.*, 2006).

3.2.3. La dégradation du tryptophane

L'induction de la tolérance par les CD tolérogéniques peut aussi s'exercer via la dégradation du tryptophane (Braun *et al.*, 2005). Ces cellules sécrètent de l'Indoleamine 2, 3-dioxygénase (IDO) qui est une enzyme responsable de la dégradation du tryptophane, un acide aminé rare et essentiel à la croissance cellulaire (Grohmann *et al.*, 2003). La dégradation du tryptophane par l'IDO entraîne donc une inhibition de la prolifération des LT. De plus, la dégradation du tryptophane par l'IDO induit la production de métabolites secondaires pro-apoptotiques (kynurenines) pour les LT (Frumento *et al.*, 2002 ; Terness *et al.*, 2002) (Schéma 13).

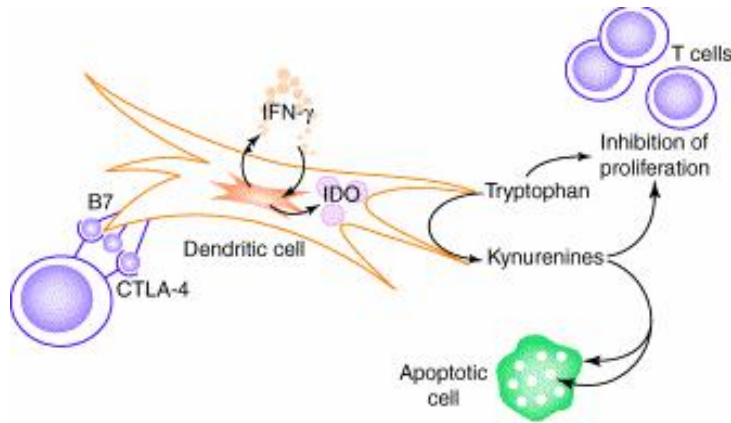


Schéma 13 : Implication de l'IDO dans l'induction de la tolérance
(Grohmann, 2003).

3.2.4. La production de cytokines anti-inflammatoires

Les cytokines anti-inflammatoires ou immunosuppressives telles que l'IL-10 ou le TGF- β ont la capacité d'induire la tolérance des LT (Levings *et al.*, 2001). Or, les CD tolérogéniques générées *in vitro* ont la capacité de produire ces cytokines (Corinti *et al.*, 2001, Cohen *et al.*, 2006 ; Gillet-Hladky *et al.*, 2006). De plus, la production d'IL-10 par les CD infiltrant les tumeurs représente un mécanisme d'échappement des tumeurs au système immunitaire. En effet, les CD prélevées sur des mélanomes invasifs produisent des quantités importantes d'IL-10 ce qui aboutit à l'anergie des LT CD8⁺ spécifiques des Ag tumoraux (Enk *et al.*, 1997 ; Steinbrink *et al.*, 1999a).

4. Les inducteurs de CD tolérogéniques

L'induction d'un profil tolérogénique des CD est régulée par de nombreux facteurs physiologiques mais aussi par certains agents thérapeutiques immunosuppresseurs.

4.1. Les Antigènes du Soi

Les Ag du Soi, produits au niveau périphérique, induisent la maturation des CD vers un profil tolérogénique afin d'éviter le développement de pathologies auto-immunes. Une source importante d'Ag du Soi reconnus par les CD est la phagocytose des cellules en apoptose. Les CD identifient les cellules de l'organisme grâce à la présence de récepteurs spécifiques à leur surface. Ainsi, le CD47 est considéré comme un marqueur du Soi pour les cellules hématopoïétiques (Oldenborg *et al.*, 2000). Lors de la phagocytose des cellules hématopoïétiques en apoptose, le CD47 se lie à un récepteur transmembranaire exprimé à la

surface des CD, le *signal-regulatory protein-á* (SIRP-á) (Tada *et al.*, 2003). Cette interaction induit la formation de CD tolérogéniques qui n'induiront pas de réponse immunitaire contre les Ag phagocytés (Braun *et al.*, 2006).

Une autre origine importante des Ag du Soi est la dégradation tissulaire et notamment la dégradation de la MEC. Certains peptides issus de la dégradation de la MEC entraînent la maturation des CD vers un profil tolérogénique, c'est le cas par exemple de la thrombospondine-1 (Doyen *et al.*, 2003).

4.2. Les molécules immunosuppressives

Les molécules immunosuppressives responsables de l'apparition de CD tolérogéniques les plus étudiées sont les cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF- β (Corinti *et al.*, 2001 ; Geissmann *et al.*, 1999). Ces cytokines sont produites par les cellules environnantes notamment par les cellules de l'inflammation et les LTreg (Mahnke *et al.*, 2007). D'autres peptides anti-inflammatoires, tels que le peptide intestinal vasoactif (VIP), induisent la tolérance des CD (Gonzalez-Rey *et al.*, 2007). Ainsi Le VIP, produit par LTh-2 dans des conditions inflammatoires, inhibe la maturation des CD induite par le LPS et oriente ces CD vers un profil tolérogénique (Delgado *et al.*, 2004).

Certains agents thérapeutiques dispensant des propriétés immunomodulatrices ont également la capacité d'induire la maturation des CD vers un profil tolérogénique. Parmi les plus utilisés, les glucocorticoïdes et l'aspirine favorisent l'apparition de CD tolérogéniques via la production de l'IL-10 et l'augmentation de l'expression de l'ILT-3 (Buckland *et al.*, 2006 ; Cohen *et al.*, 2006).

4.3. Les cellules tumorales

L'induction de la tolérance est un des mécanismes d'échappement utilisé par les cellules cancéreuses contre le système immunitaire (Pardoll., 2003). Les cellules tumorales, directement ou indirectement, produisent des facteurs solubles immunosuppresseurs (IL-10, TGF- β , VEGF, PGE2...) qui, entre autres activités, altèrent la maturation des CD les rendant tolérogéniques (Gabrilovich *et al.*, 1996 ; Pardoll., 2003 ; Steinbrink *et al.*, 1997). Par exemple, la prostaglandine E2 (PGE2), joue un rôle essentiel dans les tumeurs associées à une réponse inflammatoire chronique (Chen *et al.*, 2001) et induit la formation de CD tolérogéniques (Braun *et al.*, 2005) ce qui entraîne une inhibition de la prolifération des LT spécifiques des Ag tumoraux (Bergwelt-Baildon *et al.*, 2006).

Chapitre 4 : Inflammation et pathologies inflammatoires chroniques : rôle des peptides d'élastine

La survie d'un organisme est impossible sans un système de défense efficace contre les agressions et les blessures. Le système immunitaire est le système de défense utilisé par de très nombreux organismes comme les insectes (Hoffmann., 1995) ou les plantes (Jones and Dangl., 2006) mais la forme la plus évoluée de ce système est trouvée chez les vertébrés supérieurs. Chez les vertébrés supérieurs, le système immunitaire est classiquement découpé en deux composantes, une composante innée (ou naturelle) et une composante adaptative (ou spécifique).

L'immunité innée est le système de surveillance continu de l'organisme pour détecter une agression. En réponse à cette agression, une réponse inflammatoire localisée se met en place, de façon réflexe, ce qui permet d'éliminer par exemple la plupart des menaces pathogènes. L'amplitude de la réponse inflammatoire est alors cruciale. En effet, une réponse inflammatoire insuffisante peut conduire à des infections généralisées et à des cancers alors qu'une réponse inflammatoire excessive peut à l'inverse majorer des pathologies telles que l'athérosclérose ou la bronchopneumopathie chronique obstructive. Ainsi, dans certaines conditions physiopathologiques, la réponse inflammatoire peut se révéler plus dangereuse que le stimulus qui l'a engendrée. L'homéostasie est restaurée lorsque l'inflammation est contrôlée par une réponse anti-inflammatoire adaptée.

A. La réaction inflammatoire aiguë

L'inflammation aiguë est caractérisée par une durée limitée dans le temps et par un rétablissement, à terme, de l'homéostasie tissulaire. Chez les mammifères, la réaction inflammatoire peut être divisée en quatre grandes étapes : *i)* la reconnaissance de l'agent initiateur et l'initiation de la réponse inflammatoire, *ii)* une étape vasculaire impliquant un recrutement de cellules immunocompétentes au site inflammatoire, *iii)* une amplification de la réaction inflammatoire par l'ensemble des cellules effectrices de l'inflammation, et *iv)* l'élimination de l'agent initiateur et la réparation tissulaire.

Un des agents initiateurs de la réponse inflammatoire, couramment utilisé *in vitro*, est représenté par la famille des Lipopolysaccharides (LPS) bactériens. Et c'est l'interaction du LPS avec les monocytes, utilisés comme cellules effectrices de l'inflammation, qui représente

l'un des modèles expérimentaux le plus couramment utilisé pour étudier les mécanismes de la réaction inflammatoire.

1. Les différentes étapes de la réaction inflammatoire aiguë

1.1. Reconnaissance de l'agent initiateur et déclenchement de la réaction inflammatoire

1.1.1 Les agents initiateurs

Les facteurs déclenchant la réaction inflammatoire peuvent être classés en quatre catégories permettant de distinguer : *i)* les produits biologiques d'origine exogène tels que les agents pathogènes bactériens ou viraux, ou encore les produits biologiques issus de ces agents pathogènes (ex : toxines bactériennes), *ii)* les produits biologiques d'origine endogène comme les produits de dégradation tissulaire et cellulaire, *iii)* les facteurs physiques tels que la chaleur, le froid ou les rayons ionisants, et *iv)* les produits chimiques (acide, base, toxique).

1.1.2. Les récepteurs de l'inflammation

Les cellules et les récepteurs cellulaires qui participent à la réponse inflammatoire varient en fonction de la nature du stimulus inflammatoire. Ces stimuli sont extrêmement nombreux et hétérogènes et un organisme vertébré ne peut posséder des récepteurs pour l'ensemble des stimuli existants. Aussi, le système immunitaire, lorsqu'il est activé par des agents pathogènes, se focalise sur quelques centaines de motifs moléculaires conservés et présents chez de nombreux micro-organismes (Janeway, Jr., 1989 ; Janeway, Jr., 1992). Ces structures moléculaires, essentielles pour la survie de ces micro-organismes et absentes chez les mammifères, sont appelées "pathogen-associated molecular patterns" (PAMPs) (Akira *et al.*, 2006). Les "pattern-recognition receptors" (PRRs) sont les récepteurs du système immunitaire qui reconnaissent ces PAMPs (Medzhitov and Janeway, Jr., 1997). Les PRRs les mieux caractérisés possèdent un domaine conservé "Leucine-rich repeat" (LRR) et sont regroupés dans la famille des "Toll-like receptors" (TLRs). Ces récepteurs transmembranaires, qui sont des homologues des protéines Toll découvertes initialement chez la *Drosophila*, sont composés de domaines structuraux très conservés comme le domaine LRR, d'un domaine transmembranaire simple et d'un domaine cytoplasmique "Toll-interleukin 1 receptor" (TIR) (Medzhitov and Janeway, Jr., 1997). Une dizaine de TLRs a été identifiée chez l'Homme, chacun d'entre eux reconnaissant des ligands très spécifiques (Turvey and Hawn., 2006) (tableau 3). Les composants de la paroi des bactéries, comme le lipopolysaccharide (LPS) qui

est reconnu par le TLR-4, la flagelline qui est reconnue par le TLR-5 ou des motifs d'acides nucléiques bactériens ou viraux qui sont reconnus par le TLR-9 sont des exemples de PAMPs (Akira *et al.*, 2006).

Les PAMPs sont aussi reconnus par une autre classe de PRRs : les non-TLR. Ces derniers sont moins décrits dans la littérature mais ils ont également un rôle important dans la reconnaissance des pathogènes. Les PRRs non-TLR sont classés en trois groupes en fonction de leur localisation sérique, membranaire ou intracytoplasmique (Brown., 2006) (tableau 4).

Les PRRs sont exprimés par de nombreuses cellules comme les fibroblastes ou les cellules épithéliales mais plus généralement par les effecteurs cellulaires précoces du système immunitaire comme les macrophages, les monocytes, les cellules dendritiques, les lymphocytes B et les mastocytes (Akira *et al.*, 2006). La fixation d'un ligand sur les PRRs entraîne l'activation des voies de signalisation associées au récepteur ce qui aboutit à l'activation de facteurs de transcription régulant les gènes codant pour les médiateurs inflammatoires responsables de l'état vasculaire. Parmi les facteurs de transcription activés,

le "n" nada and

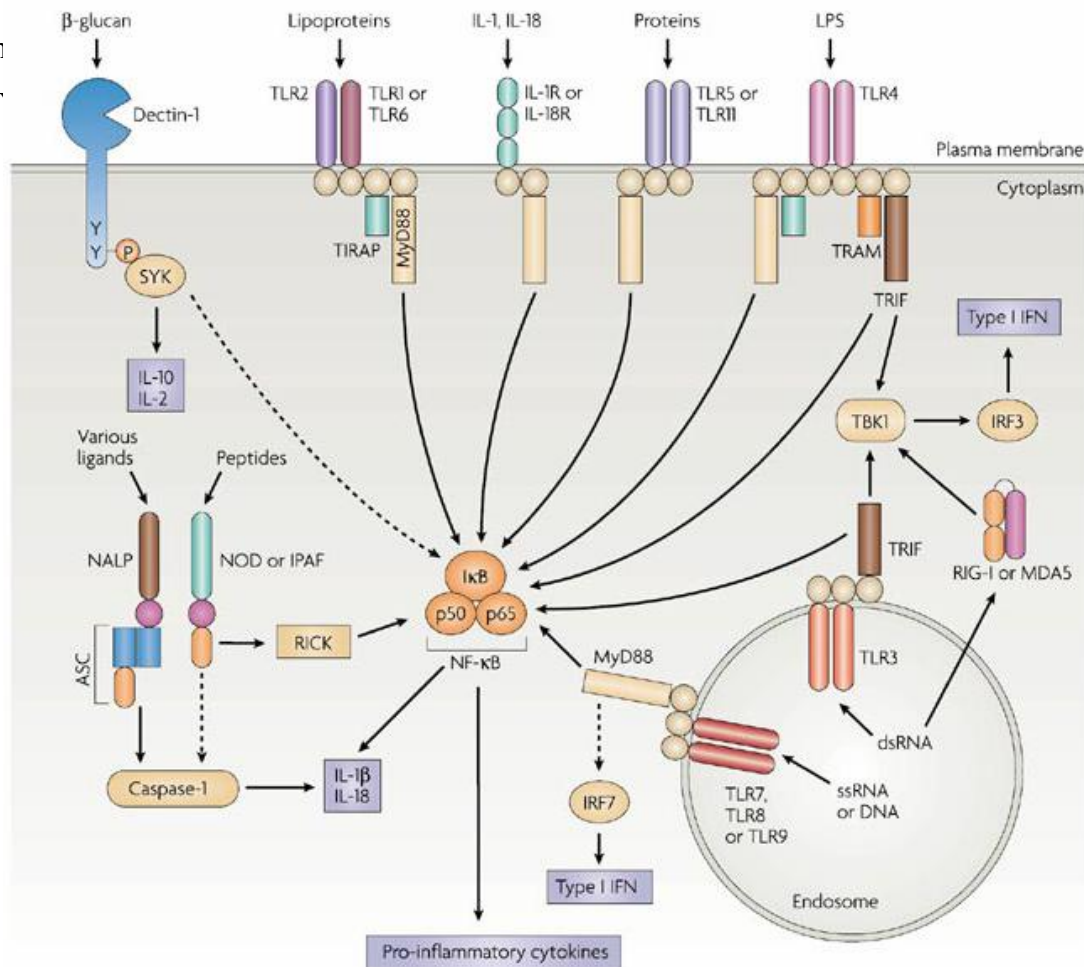


Schéma 14 : Implication de NF-κB dans la signalisation induite par la stimulation des récepteurs de l'inflammation (Trinchieri, 2007).

Récepteurs	Expression	Ligands
TLR-1	Cellules dendritiques, cellules épithéliales, PNN, lymphocytes B	« En association avec le TLR-2 »
TLR-2	Cellules dendritiques, cellules épithéliales, cellules endothéliales, monocytes, macrophages, PNN	Peptidoglycane, lipopeptides, lipoarabinomannane, porines, zymosan, hémagglutinine
TLR-3	Cellules dendritiques, cellules épithéliales	ARN double brin, poly IC
TLR-4	Cellules dendritiques, cellules épithéliales, cellules endothéliales, monocytes, macrophages, PNN, lymphocytes B	LPS, acide lipotéichoïque, mannane protéine de fusion du virus respiratoire syncytial, HSP-60, HSP-70, Fibrinogène, acide hyaluronique
TLR-5	Cellules dendritiques, épithélium intestinal, neutrophiles, monocytes	flagelline
TLR-6	Cellules épithéliales, PNN	« En association avec le TLR-2 »
TLR-7	Cellules dendritiques myéloïdes, cellules dendritiques plasmacytoïdes, cellules épithéliales, polynucléaires éosinophiles, PNN	Analogues de la guanosine, composés imidazoquinoline synthétiques, ARN simple brin murin
TLR-8	Cellules dendritiques myéloïdes, cellules dendritiques plasmacytoïdes, cellules épithéliales, PNN	Analogues de la guanosines, composés imidazoquinoline synthétiques, ARN simple brin humain
TLR-9	DC plasmacytoïdes, cellules épithéliales, lymphocytes B, macrophages, neutrophiles	Motifs CpG de l'ADN, hémozoïne
TLR-10	Cellules épithéliales, lymphocytes B, PNN	Ligand non identifié
TLR-11	Macrophages, cellules épithéliales (rein, foie, vessie)	Profiline

Tableau 3 : Les TLR chez les mammifères et leurs ligands

(D'après Akira, 2006)

Familles	PRRs	Exemples de PAMPS associés
Sérique		
Complément	C3, C1q	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i>), VIH
Transférases Lipidiques	LBP	LPS
Collectines	<i>Surfactant protein-A/-D</i> , <i>mannose-binding lectin</i>	herpes simplex virus, VIH, <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>E. coli</i>
Pentraxines	<i>Surfactant protein-A</i> , <i>pentraxin-3</i> , <i>C-reactive protein</i>	Zymosan, <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , influenza A virus, LPS
Membranaire		
Proteines "Leucine-rich repeat"	CD14	LPS, peptidoglycane, <i>E. coli</i>
récepteurs Scavenger	gp340, LTA, CD36	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , ADN bactérien
Lectine de type-C classique	<i>Mannose receptor</i> , DC-SIGN, L-SIGN	<i>Mycobactérium tuberculosis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , VIH, zymosan, virus Ebola
Lectine de type-C non-classique	Dectin-1	<i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i>
Intégrines	<i>complement receptor-3/-4</i>	Lipophosphoglycane, <i>Mycobactérium tuberculosis</i> , LPS
"Peptidoglycan-recognition protein" (PGRP)	<i>peptidoglycan-recognition protein-L, -I, -II</i>	Peptidoglycane, <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Micrococcus luteus</i>
Cytoplasmique		
Protéines induites par les interférons	protéines kinases, Protéine p65	ARN double brin, protéines virales
(<i>NOD</i>)-like receptor (NLR)	<i>nucleotide-binding oligomerization domain(NOD)-1/-2</i>	<i>Shigella flexneri</i>

Tableau 4 : Les PPR non-TLR des mammifères et leurs ligands
(d'après Brown, 2006)

1.2. Etape vasculaire de l'inflammation

Les cellules endothéliales constituent les principaux acteurs cellulaires de l'étape vasculaire. Les cellules endothéliales sont activées sous l'effet de médiateurs inflammatoires libérés à la suite du contact avec l'agent initiateur. Ces médiateurs sont pour les principaux les produits issus des systèmes d'activation plasmatiques (C5a, thrombine, bradykinine), l'histamine, le "platelet-activating factor", les prostaglandines, les cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 α , IL-6) ou les chimiokines (MIP-3 α , MIP-1 α , RANTES) (Hiromatsu and Toda., 2003 ; Sherwood and Toliver-Kinsky., 2004). Ces médiateurs permettent l'arrêt des cellules immunitaires circulantes (PNN, monocytes) en induisant l'expression de protéines d'adhérence (sélectines et intégrines) (Kubes, 2002) et leur recrutement par l'augmentation de la perméabilité vasculaire qui facilite la migration transendothéliale (Gonlugur and Efeoglu., 2004) (Schéma 15).

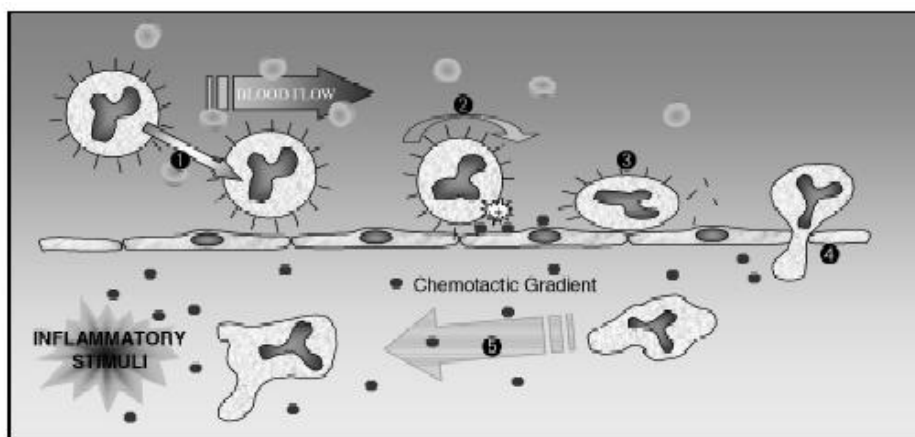


Schéma 15 : La migration transendothéliale

(Luscinskas, 1996)

Les leucocytes présents dans le sang s'arrêtent (1), roulent (2), adhèrent (3), migrent à travers l'endothélium (4) puis rejoignent le site inflammatoire (5).

1.3. Amplification de la réaction

Les PNN sont les premières cellules à coloniser le site inflammatoire. Ensuite les monocytes et les lymphocytes vont progressivement les remplacer (Doherty *et al.*, 1988 ; Melnicoff *et al.*, 1989). Ces cellules phagocytaires ingèrent les microorganismes pathogènes et les débris cellulaires puis les dégradent en utilisant une combinaison de systèmes oxydatifs (dérivés actifs de l'oxygène) et de systèmes non-oxydatifs. Les systèmes non-oxydatifs sont composés de peptides anti-microbiens (défensines) et de protéases (MMP, sérine protéases). Les systèmes oxydatifs et non-oxydatifs peuvent être libérés par exocytose dans l'environnement cellulaire immédiat ce qui contribue à l'amplification de la réaction

inflammatoire (prostaglandines, leucotriènes) (Faurschou and Borregaard., 2003). Les médiateurs tels que les facteurs du complément, les cytokines, les chimiokines réactivent les cellules présentes sur le site inflammatoire, et entretiennent la réaction inflammatoire jusqu'à l'élimination de l'agent initiateur.

1.4. Elimination de l'agent initiateur et réparation tissulaire

Le retour à l'homéostasie tissulaire implique l'élimination des éléments inducteurs de l'inflammation et des produits résultants de la dégradation du tissu altéré par les cellules phagocytaires. L'entrée en apoptose des PNN et leur phagocytose par les macrophages entraîne une diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8) (Fadok *et al.*, 1998). La désactivation de la réponse inflammatoire implique également une succession de mécanismes immunosuppresseurs (Tedgui and Mallat., 2001) nécessitant la participation de cytokines, de chimiokines et de facteurs de croissance (Garzon *et al.*, 2004). En parallèle, les macrophages produisent des cytokines anti-inflammatoires comme le TGF- β et l'IL-10 (Voll *et al.*, 1997) ainsi que des facteurs de croissance qui permettent la prolifération des fibroblastes. Ces derniers synthétisent de la tropoélastine, du collagène et de la fibronectine qui permettent la réparation des tissus lésés (Weber *et al.*, 1995).

Dans certaines conditions physiopathologiques (persistance de l'agent initiateur, réponse inflammatoire inadaptée, intervention de facteurs génétiques et/ou environnementaux), la réponse inflammatoire peut évoluer vers un état de chronicité (Benoist and Mathis., 2001 ; Rioux and Abbas., 2005). L'inflammation chronique est caractérisée par une accumulation anormale de cellules inflammatoires (PNN, monocytes/macrophages,...). Celles-ci, associées à des cellules résidentes telles que les fibroblastes et les cellules endothéliales vont alors produire un ensemble de facteurs (cytokines inflammatoires, enzymes matricielles,...) qui occasionnent d'importants dommages tissulaires (Nathan *et al.*, 1989). De façon schématique, l'inflammation chronique se différencie de l'inflammation aiguë par *i)* la coexistence des étapes vasculaires et d'amplification précédemment décrites, *ii)* une persistance de l'inflammation dans le temps et *iii)* des destructions tissulaires importantes.

La protéolyse de la matrice extracellulaire et la genèse de peptides issus de la dégradation de cette matrice sont des marqueurs de l'évolution d'un processus inflammatoire non contrôlé vers un état inflammatoire chronique.

2. Le LPS : agent initiateur de la réaction inflammatoire

2.1. Les principales caractéristiques du LPS

Le LPS (ou endotoxine) est synthétisé par les bactéries à Gram négatif. Cette molécule, présente dans la paroi bactérienne, est essentielle pour la croissance, l'intégrité et la forme de la bactérie (Rietschel *et al.*, 1985). Les différents LPS ont une architecture commune qui s'organise en trois parties (Rietschel *et al.*, 1996) (Schéma 16), *i*) le lipide A, situé à la partie proximale du LPS et à l'intérieur de la bicouche lipidique, *ii*) l'antigène O, situé à la partie distale du LPS et dont la nature polysaccharidique lui confère un caractère hydrophile, *iii*) le noyau (ou *core*) qui est de nature polysaccharidique et qui permet d'associer les deux autres parties.

Le lipide A, nommé aussi endotoxine, est la partie responsable de l'induction de la réponse immunitaire non spécifique. Le lipide A ainsi que le noyau polysaccharidique sont fortement conservés dans les différentes bactéries à Gram négatif.

En revanche, la structure de l'antigène O est le facteur déterminant pour la spécificité antigénique du LPS. Le nombre des antigènes O est différent d'une espèce bactérienne à l'autre. Chez *Escherichia. coli*, plus de 170 sérogroupes O ont été décrits (Nikaido., 1994). Situé à l'extrémité distale du LPS, l'antigène O représente l'interface entre la bactérie et le milieu extérieur. Lorsque l'antigène O est présent, le LPS complet est nommé LPS lisse (smooth LPS) alors que, lors de culture *in vitro*, les bactéries peuvent produire un LPS qui ne possède pas cet l'antigène. Ce LPS incomplet est connu sous le nom de LPS rugueux (*rough* LPS) (Hitchcock *et al.*, 1986).

Le LPS peut être à l'origine de nombreuses pathologies. Il est également impliqué dans plusieurs pathologies inflammatoires chroniques qui sont associées à une intense dégradation de l'élastine. C'est le cas de certaines pathologies artérielles et de la BPCO (cf. chapitre 4, partie B). Dans l'athérosclérose, en plus de son effet inflammatoire direct, le LPS forme un complexe avec les lipoprotéines ce qui accélère la formation des plaques d'athéromes (Schwartz and Dushkin., 2002). Au cours de la BPCO, le LPS qui est l'un des constituants de la fumée de cigarette, facteur étiologique majeur de cette pathologie, est activement impliqué dans l'initiation de la réaction inflammatoire induite par la fumée de cigarette (Hasday *et al.*, 1999).

Le principal récepteur spécifique du LPS est le complexe récepteur CD14/TLR4 qui a été mis en évidence à la surface des cellules de l'immunité comme par exemple les monocytes et les CD.

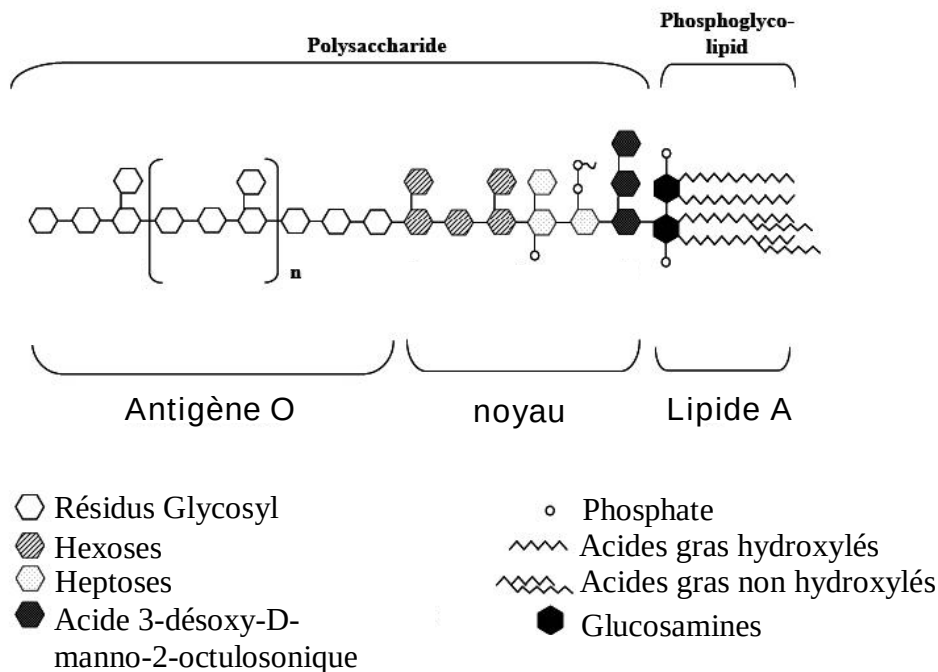


Schéma 16 : Structure d'un LPS lisse d'entérobactéries
(d'après Rietschel, 1996 et Gangloff, 2005).

2.2. Rôle du TLR4 dans les effets biologiques du LPS

Les effets du LPS sont principalement portés par le TLR4 qui a été l'un des premiers TLR identifié chez les mammifères. La reconnaissance du LPS par le TLR4 est un phénomène complexe qui nécessite un ensemble de molécules accessoires permettant d'augmenter la sensibilité des cellules exprimant ce récepteur.

2.2.1. Reconnaissance et prise en charge du LPS

La première molécule mise en jeu dans la reconnaissance du LPS est la *LPS binding protein* (LBP) qui est une protéine plasmatique synthétisée par le foie et qui se fixe au LPS circulant (Schumann *et al.*, 1990). A la surface des cellules, le LPS, soit directement, soit après liaison à la LBP, se fixe au récepteur CD14 qui est ancré à la membrane plasmique des cellules par une prolongation glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Wright *et al.*, 1990). Cependant, le récepteur CD14 ne possède pas de domaines transmembranaires ou

intracellulaires. Il ne peut donc pas être considéré, à lui seul, comme l'initiateur de l'activation de la réponse immunitaire. Le complexe LPS/CD14 doit donc interagir avec le TLR4 qui est associé à une protéine accessoire MD2. MD2 est liée au TLR4 au niveau de la partie extracellulaire et elle permet de stabiliser le complexe (Guha and Mackman., 2001 ; Shimazu *et al.*, 1999). Le TLR4 agit alors comme un transducteur du signal via son domaine cytoplasmique TIR (Qureshi *et al.*, 1999) (Schéma 17).

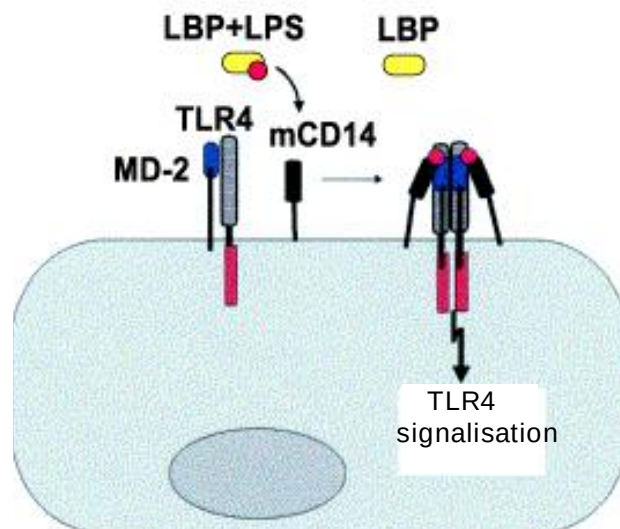


Schéma 17 : Le complexe récepteur TLR4
(D'après Martin, 2002)

2.2.2. LPS et voies de signalisation

La stimulation de cellules cibles par le LPS résulte en l'activation, la translocation et la fixation de différents facteurs de transcription sur les promoteurs des gènes inducibles par le LPS. Ces gènes codent pour des médiateurs inflammatoires comme les cytokines (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10...) et les chimiokines (IL-8, MCP-1), mais aussi pour des facteurs de transcription (p50, c-Rel...) et des inhibiteurs de transcription comme I- κ B (Sweet and Hume, 1996). La plupart des facteurs de transcription intervenant dans la signalisation du LPS sont activés par des dimérisations et des phosphorylations de différentes voies intracellulaires.

2.2.2.1. Événements précoces

La voie de signalisation initiée par la fixation du LPS/CD14 sur le TLR4 débute par le recrutement d'une protéine adaptatrice MyD88. Cette protéine est fixée sur le domaine TIR du TLR4 et elle recrute une serine/thréonine protéine kinase: l'*IL-1R-associated kinase* (IRAK)

au niveau du récepteur. Cette dernière s'auto-phosphoryle et forme alors un complexe avec une autre protéine adaptatrice (TRAF6) (Schéma 18). De plus, la stimulation du TLR4 par le LPS active rapidement certaines isoformes de protéines kinase C (PKC) (Aksoy *et al.*, 2004). En effet, sous l'action du LPS les PKC- α et β migrent du cytosol à la membrane ce qui correspond à leur activation (Kontny *et al.*, 2000).

Ces différents événements aboutissent à l'activation de nombreuses cascades protéiques, notamment celles impliquant les membres de la famille des *interferons regulatory factors* (IRF), de la famille des *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) et de la voie IKK/NF- κ B (Kawai and Akira., 2007 ; Medzhitov and Janeway, Jr., 2000).

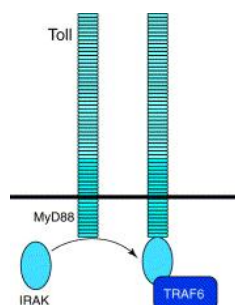


Schéma 18 : Événements précoces du signal de transduction du TLR4
(Medzhitov, 2000).

2.2.2.2. les IRF dans la signalisation du TLR4

Les facteurs de transcription de la famille des IRF sont impliqués dans les réponses immunitaires anti-virales via principalement la régulation des gènes codants pour les IFN de type I. A ce jour, neuf membres ont été identifiés dont certains tels que IRF-3 et IRF-7 sont impliqués dans les voies de signalisation élicitées par le LPS. En réponse à l'activation du TLR4, la protéine *TIR-containing adaptor molecule-2* (TICAM-2) est recrutée et se lie à TICAM-1 qui entraîne la phosphorylation et la dimérisation d'IRF-3 et d'IRF-7 (Seya *et al.*, 2005). L'activation de ces deux facteurs de transcriptions, présents dans le cytoplasme, entraîne leur translocation dans le noyau où ils régulent principalement les promoteurs des gènes IFNA et IFNB codants pour les IFN de type I (Honda and Taniguchi., 2006). Bien que l'implication du TLR4 dans l'immunité anti-virale ne soit pas clairement établie, l'induction des gènes IFNB est essentielle à la maturation des cellules dendritiques et à l'initiation d'une réponse immunitaire spécifique (Hoebe *et al.*, 2003). De plus, ces facteurs de transcriptions sont impliqués dans la régulation d'autres gènes de la réponse immunitaire tels que les gènes

codant pour les chimiokines CXCL9 et CXCL10, notamment par l'intermédiaire de leur liaison avec la sous-unité p65 de NF- κ B (Ogawa et al., 2005 ; Sakaguchi et al., 2003).

2.2.2.3. la voie des MAPK

Les MAPK constituent un réseau complexe de cascades enzymatiques activé par divers stimuli au niveau des récepteurs membranaires (facteurs de croissance, cytokines, stress, protéines d'adhésion,...). Les MAPK conduisent des signaux jusqu'au noyau pour influencer les différents programmes cellulaires (prolifération, différenciation, mort cellulaire, migration cellulaire,...) (Kyriakis and Avruch., 2001 ; Schaeffer and Weber., 1999).

Les cascades MAPK ont été très conservées au cours de l'évolution des eucaryotes et reposent sur une architecture impliquant trois niveaux de kinases successifs. Cette structure comporte une MAPK, un activateur de MAPK (MEK, MKK, ou MAPK kinase), et un activateur de MAPKK (MEK kinase [MEKK] ou MAPK kinase kinase). La transmission du signal s'effectue par des phosphorylations séquentielles et l'activation des composants respectifs de chaque cascade (Sweet and Hume, 1996) (Schéma 19).

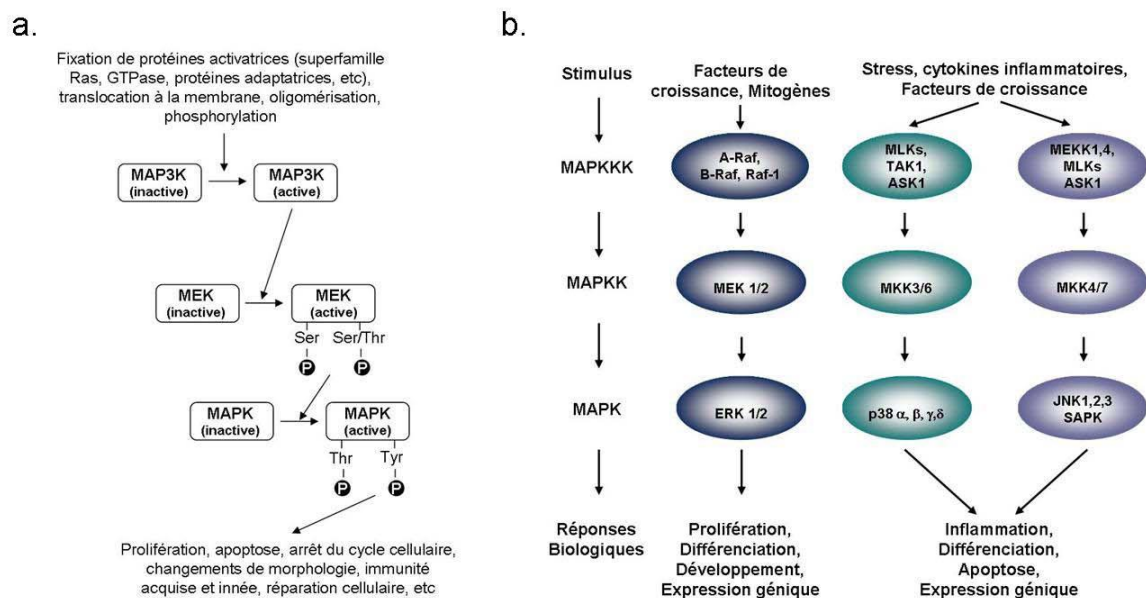


Schéma 19 : Cascades de signalisation des MAPK.

a. phosphorylations et activations séquentielles d'après un schéma commun à toutes les voies (d'après Kyriakis, 2001),

b. les composés respectifs des trois voies MAPK principales (d'après Garrington, 1999).

Parmi l'ensemble des voies MAPK, trois ont été particulièrement décrites : la voie Erk 1/2 (Extracellular signal regulated kinase 1/2), la voie p38, et la voie JNK 1/2 (*c-Jun N-terminal kinase 1/2*)/SAPK (*stress activated protein kinase*)

a) La voie Erk

Dans les monocytes et les CD dérivées de monocytes, Erk1 (44 kDa, p44) et Erk2 (42 kDa, p42) sont activées lors d'une stimulation avec le LPS. Les MAPK Erk1/2 sont phosphorylées au niveau d'une thréonine et d'une tyrosine sur le motif consensus TEY par MEK1 (44 kDa) et MEK2 (45 kDa) qui sont elles mêmes activées par phosphorylation sur les sérines du motif conservé SMANS par des kinases appelées Raf (English and Cobb., 2002). Il a été montré que Ras et c-Raf sont impliqués dans la voie MEK lors de l'expression de TNF- α en réponse au LPS (Geppert *et al.*, 1994). L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de MEK a également révélé une diminution de la production de plusieurs cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-1, IL-8) induites par le LPS (Scherle *et al.*, 1998). La voie Erk1/2 agit ensuite sur différentes cibles comme les facteurs de transcription Elk1 ou NF- κ B (Marais *et al.*, 1993 ; Parameswaran *et al.*, 2006).

b) La voie p38

Le traitement des monocytes et des CD dérivés des monocytes par le LPS est rapidement suivi par l'activation de molécules de signalisation (Cdc42 and Rac1) qui activent la voie p38 (Bagrodia *et al.*, 1995 ; Utsugi *et al.*, 2006 ; Zhang *et al.*, 1995). Ainsi, les MAPKKK (PKR, TAK-1,...) et les MAPKK (MKK3, 6 et 4) sont activées par des cascades de phosphorylations qui aboutissent à l'activation de la p38 (Han *et al.*, 1996 ; Zhang *et al.*, 2000). Celle-ci peut, à son tour, activer des facteurs de transcription comme CREB et ATF-1 (Rolli *et al.*, 1999). L'implication de la p38 dans la signalisation induite par le LPS a été démontrée grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de cette voie (Lee *et al.*, 1999).

c) La voie JNK

Une autre voie de MAPK rapidement activée par le LPS dans les monocytes est la voie JNK (Hambleton *et al.*, 1996). L'activation des JNKs est obtenue par double phosphorylation sur thréonine et tyrosine sur un motif conservé TPY (English and Cobb., 2002) par deux MKKs, MKK4 et MKK7. Ces protéines JNK peuvent phosphoryler certains facteurs de transcription comme c-Jun ou Elk-1 qui régulent l'expression de plusieurs gènes codant pour des protéines inflammatoires (Aronheim., 1997).

2.2.2.4. la voie de signalisation IKK/NF- κ B

Il est clairement établi que les mécanismes de l'immunité innée mis en jeu lors d'une réaction au LPS utilisent les voies de signalisation NF- κ B. Celles-ci ne sont pas restreintes à l'immunité innée et elles jouent un rôle très important dans la réponse immune spécifique notamment lors de la maturation des CD (Yoshimura *et al.*, 2001) et pour la protection des lymphocytes contre l'apoptose (Gerondakis *et al.*, 1998). Les membres de la famille NF- κ B possèdent un domaine conservé de fixation sur l'ADN et de dimérisation appelé le domaine Rel. Chez les mammifères, il existe 5 sous-unités de NF- κ B: p65 (RelA), c-Rel, RelB, p105/p50 et p100/p52 qui forment différents homo- et hétéro-dimères (Baldwin, Jr., 1996) (Schéma 16). Le dimère dont l'activation est la plus connue est la forme p50/p65 (RelA).

La famille de l'inhibiteur de NF- κ B (I κ B) comprend également plusieurs isoformes dont les plus connues sont I κ B α et I κ B β (Schéma 20).

En situation "basale", le dimère p50/p65 est maintenu dans le compartiment cytoplasmique par une liaison à la protéine inhibitrice I κ B α . Après une stimulation par le LPS, la voie NF- κ B est activée par une cascade séquentielle de protéines kinases, IKK α et β , aboutissant à la phosphorylation (sur les sérine 32 et 36) et l'ubiquitination (sur les Lysine 20 et 21) de I κ B α ce qui entraînent sa dégradation par le protéasome-26S (Karin and Ben Neria., 2000). La dégradation de I κ B α libère ainsi le dimère p50/p65 qui migre dans le noyau pour activer les gènes cibles. Les kinases IKK α et β forment un grand complexe protéique comprenant l'ensemble protéique *NF- κ B essential modulator* (NEMO ou IKK γ) (Zandi *et al.*, 1997) (Schéma 21). Des études suggèrent que IKK β plus que IKK α est essentiel à l'activation de NF- κ B dans les cellules monocytaires stimulées par le LPS (O'Connell *et al.*, 1998).

Pour être entièrement activé, dans les monocytes, NF- κ B doit migrer dans le noyau mais aussi être phosphorylé au niveau de la sous-unité p65 via la voie de signalisation de la *phosphatidyl inositol 3 kinase* (PI3K) et Akt (Herrera-Velit *et al.*, 1997).

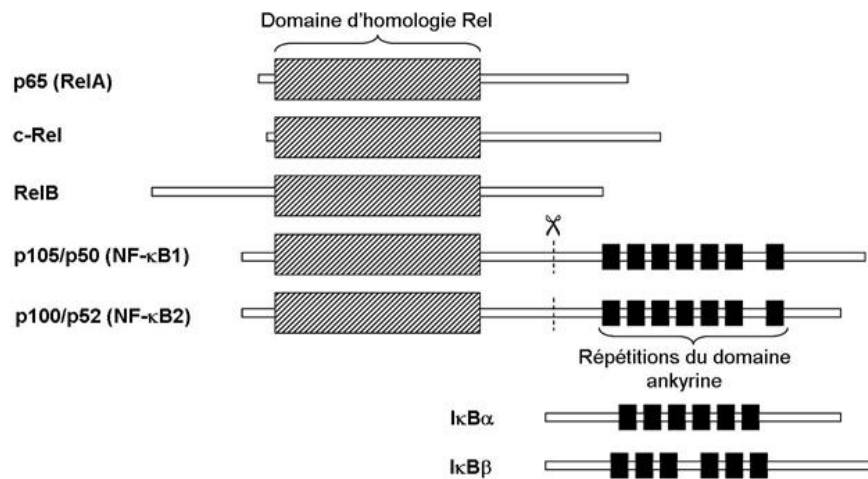


Schéma 20 : Les protéines des familles NF-êB et I-êB.

Les protéines de la famille NF-êB sont caractérisées par un domaine d'homologie Rel. Les protéines I-êB possèdent des domaines répétés d'ankyrine. Les protéines p105 et p100 possèdent les 2 types de domaines avant leur clivage (d'après Baldwin, 1996).

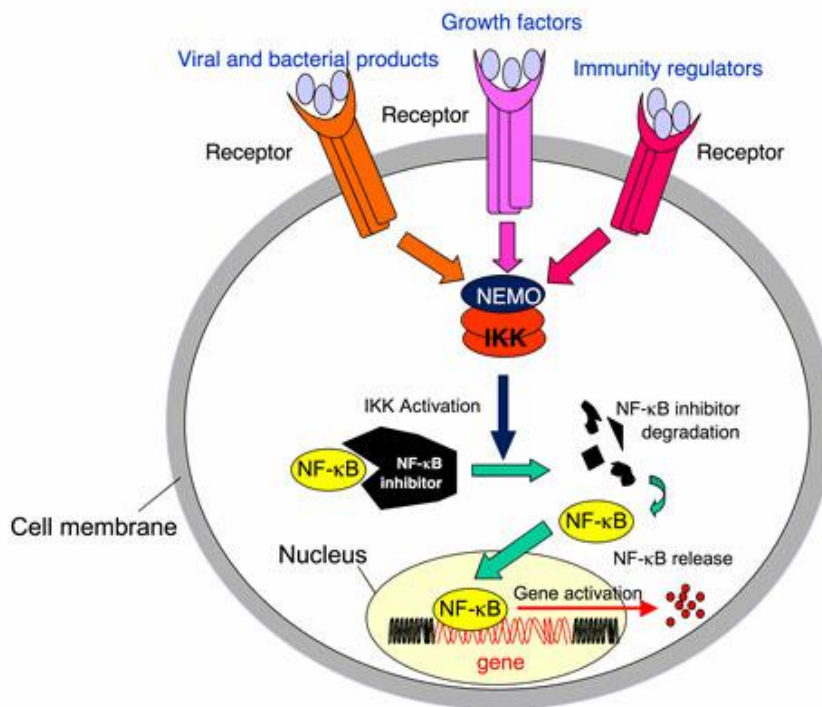


Schéma 21 : Modèle d'activation de NF-êB.

(<http://www.pasteur.fr/recherche/unites/reac/en/im/ANFkBcyclec.jpg>, 2007).

B. Pathologies Inflammatoires chroniques et peptides d'élastine

1. Pathologies artérielles inflammatoires

La physiopathologie de l'athérosclérose et de l'Anévrisme Aortique Abdominal (AAA) est la conséquence d'un processus multifactoriel caractérisé par un profond remodelage de la paroi aortique lié *i)* à une intense dégradation des molécules de la MEC et en particulier de l'élastine, *ii)* à une réponse inflammatoire chronique, et *iii)* à un puissant processus de néovascularisation (Ailawadi *et al.*, 2003 ; Wassef *et al.*, 2001). Le rôle crucial de l'inflammation chronique dans l'athérosclérose (Libby., 2002) et dans l'AAA a été clairement établi (Shimizu *et al.*, 2004 ; Shimizu *et al.*, 2006).

La dégradation des fibres élastiques par les élastases est une caractéristique de l'athérosclérose et de l'AAA, ce qui entraîne une augmentation importante de la concentration de peptides d'élastine (PDE) dans la circulation sanguine au cours de ces pathologies (Baydanoff *et al.*, 1987 ; Fulop, Jr. *et al.*, 1990 ; Petersen *et al.*, 2002). Les PDE qui sont produits en grande quantité catalysent de nombreux changements dans la paroi artérielle. Ils amplifient le mécanisme d'élastolyse en augmentant la production d'élastases par les cellules musculaires lisses (Cohen *et al.*, 1992 ; Hornebeck and Robert., 1977). De plus, ils entraînent une calcification de la paroi aortique en favorisant un phénotype ostéogénique des cellules musculaires lisses (Simionescu *et al.*, 2005). Ces peptides interviennent également dans le maintien du processus inflammatoire en exerçant des effets chimioattractants puissants vis-à-vis des monocytes (Hance *et al.*, 2002).

L'influence des PDE sur la polarisation des lymphocytes T est un élément important à prendre en compte dans la compréhension des pathologies artérielles inflammatoires. Dans les lésions athérosclérotiques, la réponse inflammatoire est caractérisée par une prédominance du phénotype cytokinique de type Th-1 (Frostegard *et al.*, 1999) alors que dans l'AAA la balance cytokinique semble pencher vers un profil de type Th-2, même si cette donnée reste à ce jour controversée (Schonbeck *et al.*, 2002 ; Xiong *et al.*, 2004). La présence du récepteur de l'élastine a été mise en évidence à la surface des lymphocytes T isolés des plaques d'athérome (Peterszegi *et al.*, 1996), et, plus récemment à la surface des lymphocytes T circulants (Debret *et al.*, 2005). Par ailleurs, il a été clairement établi que l'interaction des PDE avec leur récepteur spécifique exprimé à la surface des lymphocytes T circulants oriente les lymphocytes T vers un profil de synthèse de cytokines de type Th-1 (IL-2, IFN- γ) et inverse la

polarisation de lymphocytes T orientés vers un profil Th-2 (IL-4, IL-5, IL-10) au profit d'un profil de type Th-1 (Debret *et al.*, 2005). La prise en compte de ces observations dans la compréhension du rôle des PDE dans le développement de l'athérosclérose et de l'AAA est importante. Ainsi, l'évolution vers un état inflammatoire chronique d'une paroi aortique endommagée pourrait, par le biais d'une forte concentration de peptides solubles d'élastine circulants, réguler l'équilibre de la balance Th-1/Th-2 et prévenir le développement d'un AAA par l'inversion du profil Th-2 ou amplifier le profil Th-1 qui est associé à l'athérosclérose.

Sur un plan physiopathologique, la présence des PDE a été démontrée dans les lésions vasculaires (Juvonen *et al.*, 1994) et leur augmentation dans la circulation sanguine est un biomarqueur de risques de rupture dans l'AAA (Lindholt *et al.*, 1997 ; Petersen *et al.*, 2002). Par ailleurs, l'injection du peptide d'élastine VGVAPG dans l'aorte infrarénale du rat a un effet proangiogénique qui conduit à un phénotype d'AAA chez l'animal (Nackman *et al.*, 1997). Cet effet proangiogénique des PDE a été récemment confirmé par la mise en évidence d'une augmentation de la migration des cellules endothéliales et d'une accélération de la formation de pseudotubes sous l'influence du peptide VGVAPG (Robinet *et al.*, 2005).

2. La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO)

La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) représente un groupe hétérogène de pathologies, incluant la bronchite chronique ou l'emphysème, et ayant en commun une obstruction progressive non réversible des voies respiratoires.

La BPCO est associée à une inflammation chronique caractérisée par une accumulation de PNN, de macrophages et de lymphocytes T (principalement CD8⁺) dans le parenchyme pulmonaire. La fumée de cigarette qui est le facteur étiologique majeur de la BPCO, provoque une augmentation du nombre de PNN dans les lavages bronchoalvéolaires (LBA) (Eidelman *et al.*, 1990 ; Finkelstein *et al.*, 1995) et une augmentation des PNN, de macrophages et de lymphocytes T CD8⁺ dans l'épithélium bronchique des patients BPCO (Fournier *et al.*, 1989).

L'inflammation chronique qui survient au cours de la BPCO et qui conduit à un remodelage de la paroi des voies aériennes est caractérisée par une production importante de protéases par les cellules inflammatoires. Ces protéases sont directement impliquées dans les lésions tissulaires de la BPCO. Par ailleurs, elles participent activement à la dégradation des fibres élastiques du parenchyme pulmonaire générant ainsi des PDE actifs qui sont impliqués dans la progression de la BPCO (Houghton *et al.*, 2006).

2.1. BPCO et élastases

Le recrutement et l'activation des PNN et des macrophages induit la production de protéases impliquées dans la destruction du parenchyme pulmonaire. Ainsi, l'activation des PNN engendre la production *i)* de serines protéases (élastase du neutrophile, protéinase 3, cathepsine G) (Kao *et al.*, 1988 ; Lesser *et al.*, 1992 ; Shapiro *et al.*, 2003) qui peuvent induire un emphysème dans des modèles animaux, *ii)* de cystéines protéases (caspase 3/9, cathepsines K, L, S et V), et, *iii)* de MMPs comme la MMP-1 (Imai *et al.*, 2001), la MMP-2 (Segura-Valdez *et al.*, 2000), la MMP-9 (Cataldo *et al.*, 2000) et la MMP-12 (Hautamaki *et al.*, 1997) qui sont surexprimées dans les tissus pulmonaires de sujets emphysémateux. Par ailleurs, des inhibiteurs de ces protéases permettent de protéger d'un emphysème des souris soumises à un tabagisme expérimental (Selman *et al.*, 2003). Enfin, le risque d'emphysème est augmenté chez les individus ayant un déficit en α -1 antitrypsine qui est le principal inhibiteur de l'élastase du neutrophile (Stoller., 2003).

2.2. Influence des peptides d'élastine au cours de la BPCO

L'importante dégradation de l'élastine dans les BPCO entraîne la production de PDE qui sont retrouvés dans les LBA, dans le mucus, dans le sang périphérique et dans les urines de patients atteints de BPCO. Chez les patients atteints de BPCO et dans des modèles murins reproduisant des lésions pulmonaires, le taux d'élastase du PNN corrèle avec le taux de PDE dans les LBA (Betsuyaku *et al.*, 1996 ; Houghton *et al.*, 2006). La présence des PDE dans différents fluides biologiques en fait des biomarqueurs importants de l'évolution de la BPCO (Cantor and Shteyngart., 2004 ; Schriver *et al.*, 1992).

Les PDE, comme le peptide VGVAPG, exercent un fort pouvoir chimioattractant vis-à-vis des monocytes circulants (Senior *et al.*, 1980). Une étude récente a montré que les PDE présents dans les LBA étaient responsables du recrutement de monocytes sur le lieu de d'inflammation. En effet, l'accumulation de macrophages dans le tissu pulmonaire est réduite par un anticorps monoclonal bloquant le peptide VGVAPG chez des souris exposées à la fumée de cigarette (Houghton *et al.*, 2006).

Les PDE peuvent avoir un effet délétère direct sur la BPCO. En effet, ces peptides induisent la synthèse de MMP-12 par de nombreux types cellulaires, MMP-12 qui participe au recrutement des macrophages et augmente la destruction des tissus pulmonaires (Gronski, Jr. *et al.*, 1997). Les PDE augmentent également la production de dérivés actifs de l'oxygène par les monocytes humains (Fulop, Jr. *et al.*, 1986). Or, le stress oxydatif, lié à la fumée de

cigarette ou aux cellules inflammatoires, est un facteur important impliqué dans la physiopathologie de la BPCO (Barnes., 2000).

3. Le mélanome

Il est aujourd'hui clairement établi que la progression d'un mélanome est associée à une réponse inflammatoire chronique (Dalglish and O'Byrne., 2002). De nombreuses cellules participant à la réaction inflammatoire sont retrouvées en périphérie et au sein même de la tumeur. Ces cellules, ainsi que les mélanocytes eux-mêmes, produisent de grandes quantités de médiateurs inflammatoires qui influencent la croissance des cellules tumorales et la formation des métastases (Karin and Greten., 2005). Par exemple, de nombreuses protéases sont produites (sérines protéases, MMP), ce qui conduit à la dégradation de la MEC et facilite ainsi l'invasion tumorale (Fisher *et al.*, 1998). La dégradation de la MEC entraîne la production de matrikines qui dispensent à leur tour des effets biologiques sur le mélanome (Maquart *et al.*, 2004).

Ainsi, l'invasion tumorale s'accompagne d'une dégradation intense des fibres d'élastine au niveau du front de migration et les peptides libérés améliorent le pouvoir invasif des mélanocytes (Ntayi *et al.*, 2004). Cette étude de Ntayi et collaborateurs démontre que les peptides d'élastine induisent une production intense de MMP-2 et de MT1-MMP qui dégradent le collagène de type I et facilitent ainsi la progression tumorale. Par ailleurs, ce phénomène s'amplifie lui-même car les peptides d'élastine, produits lors de la dégradation de la MEC, augmentent la prolifération des fibroblastes de la peau et l'expression de proMMP-1 et -3 par ces mêmes cellules ce qui contribue à la dégradation de la MEC (Brassart *et al.*, 2001 ; Kamoun *et al.*, 1995).

La production de cytokines pro-inflammatoires est un autre facteur important du développement métastatique du mélanome (Lazar-Molnar *et al.*, 2000). Par exemple, l'IL-8 augmente la prolifération et le pouvoir métastatique des mélanocytes en induisant leurs chimioattraction et leur migration transendothéliale (Ramjeesingh *et al.*, 2003 ; Varney *et al.*, 2003). Or, Debret et collaborateurs ont montré que les peptides d'élastine, via l'activation des MAPK, induisent l'augmentation de l'expression de l'IL-8 mais aussi de l'IL-1 β et de Gro- α (Debret *et al.*, 2006).

Enfin, l'angiogenèse est une condition indispensable à la progression d'un mélanome (Sosman and Puzanov., 2006) et les PDE accélèrent la formation des pseudotubes par les cellules endothéliales vasculaires participant ainsi à ce mécanisme (Robinet *et al.*, 2005).

But du travail

Une dégradation intense de l'élastine a été décrite au cours de processus inflammatoires siégeant dans des tissus riches en élastine. Cette dégradation s'accompagne de la production de peptides solubles d'élastine doués d'activités biologiques. Les fonctions biologiques des peptides d'élastine ont été mises en évidence sur de nombreux types cellulaires. En revanche, peu d'études ont été réalisées sur les cellules impliquées dans les réponses inflammatoires et immunitaires. Au cours de ce travail de thèse nous nous sommes intéressés aux rôles des peptides d'élastine dans la régulation des fonctions effectrices des monocytes humains et des cellules dendritiques humaines.

Les données de la littérature montrent que les monocytes humains expriment le récepteur à l'élastine à leur surface et que les peptides issus de la dégradation de l'élastine ont un effet chimio-attractants vis-à-vis de ces cellules. Par ailleurs, des travaux récents réalisés dans notre laboratoire ou en collaboration avec notre laboratoire ont permis de montrer que les peptides d'élastine *i)* polarisent la réponse lymphocytaire T vers un profil de sécrétion de cytokines de type Th-1, et, *ii)* activent la synthèse de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β par le biais de l'activation du facteur de transcription NF- κ B.

Sur la base de ces différentes données expérimentales, nous avons émis l'hypothèse que les produits de dégradation de l'élastine pourraient être impliqués :

? Dans la régulation de la synthèse des cytokines de l'inflammation par les monocytes humains et que cet effet pourrait impliquer la voie de signalisation NF- κ B.

? Dans la régulation de propriétés effectrices (migration, maturation, synthèse de cytokines) des cellules dendritiques humaines.

L'ensemble du travail présenté dans ce document a été réalisé à l'UFR de Pharmacie de Reims dans le Laboratoire d'Immuno-Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire (IPCM) de l'Equipe d'Accueil 3796. Ce travail s'intègre dans l'axe II "inflammation, infection et réparation tissulaire" du projet stratégique de l'IFR 53 au sein du pôle "Biomolécules et Biomatériaux".

Matériels et Méthodes

Les "matériels et méthodes" présentant les différentes techniques et approches expérimentales utilisées dans le cadre de ce travail de thèse sont détaillées dans les deux articles qui sont intégrés à ce document. En conséquence, nous nous sommes restreints dans la partie "matériels et méthodes" de la thèse à la seule description détaillée des méthodologies ayant permis d'isoler avec une grande pureté les différentes populations cellulaires que nous avons utilisées au cours de ce travail. Les monocytes humains non différenciés ou différenciés en cellules dendritiques ont été obtenus par la technique d'élutriation à contre-courant. Les Lymphocytes T CD4⁺ que nous avons utilisés pour les expériences de présentations antigéniques ont été obtenus par la combinaison d'une technique d'élutriation à contre-courant et d'une technique de tri cellulaire par cytométrie en flux. Par ailleurs l'analyse phénotypique des différentes populations cellulaires étudiées a été réalisée par la technique de cytométrie en flux.

A. Isolement des monocytes et des lymphocytes humains par la technique d'élutriation à contre-courant

Les cellules mononucléées humaines ont été isolées du sang périphérique de donneurs sains séronégatifs pour le VIH-1, le VIH-2, le virus de l'hépatite B et C, ainsi que pour les virus HTLV. Les poches de sang (300 mL environ) ont été prélevées en fin de cytophérèse, chez des hommes volontaires âgés de 40 à 60 ans, par le personnel dédié de l'Etablissement de Transfusion Sanguine (ETS) de Reims. L'obtention des poches de cytophérèse, leur utilisation à des fins de recherche ainsi que l'élimination des populations cellulaires étudiées ont été définies par un accord tripartite établi entre l'ETS, le service d'hématologie de l'hôpital de Reims et notre équipe de recherche.

1. La technique d'élutriation à contre-courant

1.1. Principe

L'élutriation à contre-courant est un procédé de séparation qui permet la séparation des différentes populations de cellules mononucléées du sang périphérique. Cette technique combine deux principes physiques, *i)* la centrifugation qui est un procédé de sédimentation

sous l'effet d'une force centrifuge, et, *ii*) l'élutriation qui est un procédé de séparation sous l'effet d'un flux de tampon dont la vitesse d'écoulement est contrôlée par une pompe péristaltique. La séparation des différentes populations cellulaires se fait en fonction de leur taille et de leur densité. Le contenu de la poche de cytophérèse est introduit, à l'aide d'une pompe péristaltique, dans une chambre d'élutriation conique tournant à grande vitesse.

Le système d'élutriation qui a été utilisé pour isoler les monocytes et les lymphocytes humains est un élutrieur Beckman J6-MC (Beckman-Coulter®, USA). Le rotor de la centrifugeuse est réfrigéré à + 4°C tout au long de la manipulation. Le schéma 22 présente le montage réalisé pour l'élutriation. Le tampon d'élutriation est un tampon phosphate glucosé (Solution 745-BF77, Braun-France) contenant 1 % d'albumine sérique humaine (Vialebex, LFB-France). Les cellules sont collectées en fin d'élutriation dans un système collecteur réfrigéré à + 4°C.

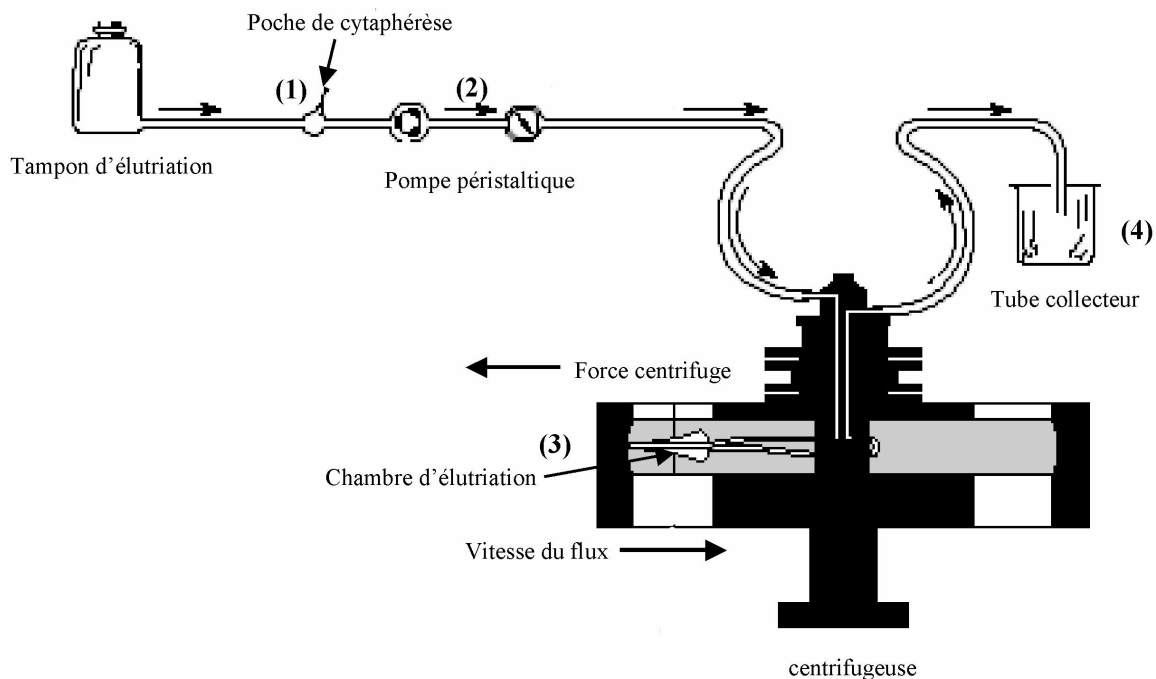


Schéma 22 : Le système d'élutriation JE-6B (Beckman-Coulter®)
(d'après la fiche technique de Beckman,-Coulter®).

1. Injection des cellules dans le système et entraînement des cellules par le tampon d'élutriation
2. Le débit du tampon d'élutriation est régulé par une pompe péristaltique
3. Les cellules pénètrent dans la chambre d'élutriation qui est soumise à une force centrifuge
4. Les cellules sont éluées en fonction de leur taille et collectées dans des tubes collecteurs

1.2. Méthodologie

A une vitesse constante de la force centrifuge et à un débit constant du flux de tampon, les cellules introduites dans la chambre d'élutriation forment un gradient de répartition qui est fonction de leur taille et de leur densité ; les cellules les plus petites se situent au sommet de la chambre et les cellules les plus grosses se placent au fond de la chambre. Lorsque le débit du fluide est augmenté, l'équilibre dynamique dans lequel se situent les cellules est rompu. Les cellules vont alors être éluées selon un ordre croissant de taille et de densité (schéma 23). Cette technique permet d'isoler les cellules mononucléées avec un rendement de l'ordre de 85 à 90% et une pureté supérieure à 90%.

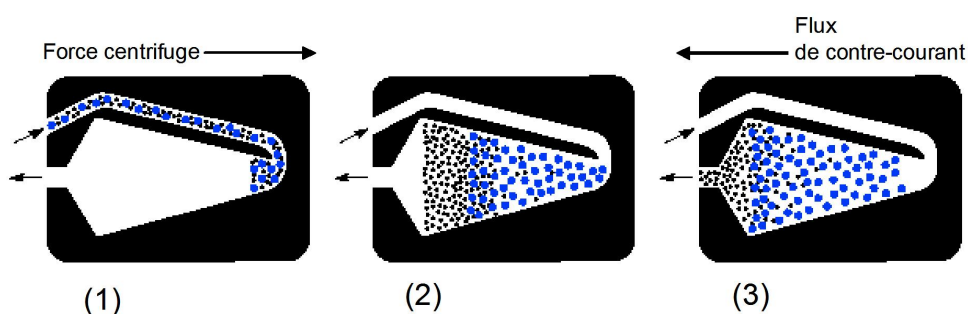


Schéma 23 : Les trois phases de répartition des cellules au cours de l'élutriation
(d'après la fiche technique de Beckman-Coulter®).

1. L'échantillon dilué dans le tampon d'élutriation est injecté dans la chambre
2. Le gradient cellulaire se forme sous l'effet des deux forces opposées qui s'équilibrent
3. L'augmentation du débit du contre-courant permet l'élution des cellules

2. Elutriation des lymphocytes et des monocytes humains

Le débit du tampon d'élutriation est ajusté à 45 mL/min au moment de l'introduction des cellules dans la chambre d'élutriation qui est soumise à une force centrifuge constante de 1800 g. Une première fraction d'élutriation contenant des plaquettes, des hématies et des débris cellulaires est récoltée. Le débit du flux de tampon est alors augmenté par paliers pendant 30 min afin de récolter une seconde fraction d'élutriation contenant principalement des lymphocytes. Cette fraction est contaminée par des hématies qu'il sera nécessaire d'éliminer par une technique de centrifugation en gradient de densité (cf paragraphe 3 du présent chapitre). Une fois les lymphocytes collectés, une nouvelle augmentation du débit (jusqu'à 49 mL/min) est effectuée afin d'éliminer progressivement tous les lymphocytes

résiduels. Cette étape dure entre 2 et 3 heures. Le débit et la vitesse de centrifugation sont alors réduits respectivement à 30 mL/min et à 1400 g afin d'éluer l'ensemble des monocytes (temps d'élution de 45 min). Cette fraction monocyttaire est pure à plus de 95 %.

La taille des cellules éluées est contrôlée tout au long de l'élutriation à l'aide d'un Multisizer II (Beckman-Coulter®) et chaque variation de débit est effectuée en fonction des populations cellulaires observées.

Pour chacune des expériences réalisées avec les monocytes de la fraction monocyttaire d'élutriation, la pureté cellulaire a été vérifiée par la technique de cytométrie en flux. Seules les populations de monocytes pures à plus de 95% ont été utilisées dans les différentes expériences (cf partie B du Matériels et Méthodes).

3. Elimination des hématies de la fraction lymphocytaire par centrifugation en gradient de densité

Le LymphoprepTM (Abcys) est une solution isoosmotique de densité déterminée ($d = 1.077$ g/mL) permettant une séparation des cellules mononucléées en une seule étape. Les cellules mononucléées (monocytes et lymphocytes) de densité inférieure à 1.077 g/mL sont retenues à l'interface plasma/LymphoprepTM alors que les hématies et les PNN de densité supérieure sédimentent à travers le LymphoprepTM au cours de la centrifugation.

Trente millilitres de la fraction lymphocytaire d'élutriation ont été déposés sur un coussin de 15 mL de LymphoprepTM puis centrifugés à 900 g pendant 25 min à + 20°C. La centrifugation permet l'obtention d'un anneau lymphocytaire situé à l'interface entre le LymphoprepTM et le plasma (Schéma 24). Cet anneau a été prélevé délicatement par aspiration puis les cellules ont été lavées 3 fois dans une solution saline, *Phosphate Buffered Saline* (PBS) 1x (Invitrogen) par centrifugation à 400 g pendant 10 min et à + 20°C.

Les lymphocytes obtenus après la technique de centrifugation en gradient de densité ont été analysés dans un second temps par la technique de cytométrie en flux puis triés afin de récupérer de façon sélective la sous-population des lymphocytes T CD3⁺CD4⁺ utilisé dans les expériences de présentation antigénique. Seuls les tris cellulaires ayant permis d'obtenir une pureté de lymphocytes T CD3⁺CD4⁺ supérieure à 99% ont été pris en compte (cf partie B du Matériels et Méthodes).

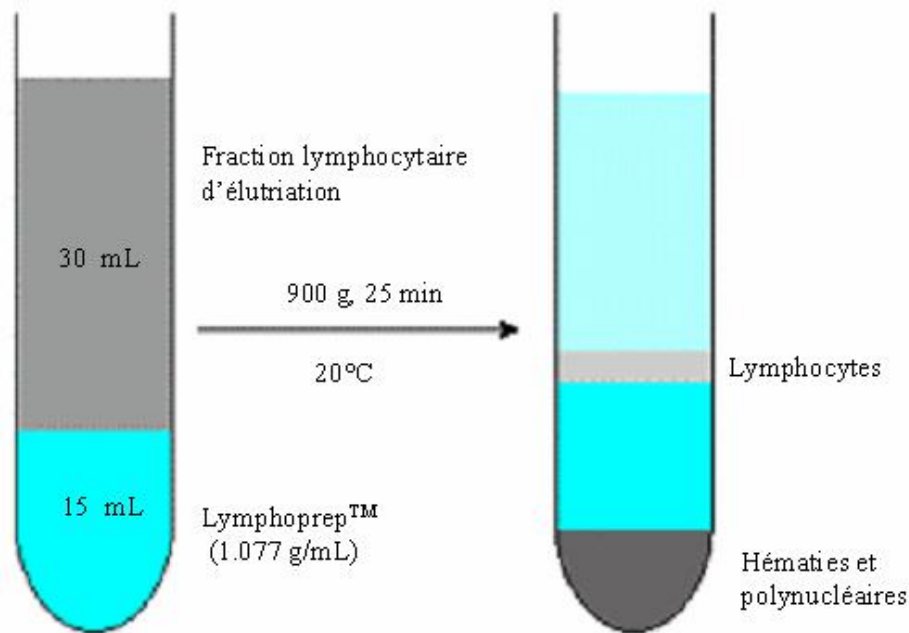


Schéma 24 : Isolement des lymphocytes par le LymphoprepTM
(d'après la fiche technique d'Abcys).

B. Analyse de la pureté des populations cellulaires et tri des Lymphocytes T CD3⁺CD4⁺ par la technique de cytométrie en flux

1. Principe de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique qui permet la mesure simultanée de différentes caractéristiques (taille, complexité et fluorescence) d'une cellule isolée entraînée par un flux liquide. Ces mesures sont effectuées lorsque les cellules passent, les unes derrière les autres, dans une chambre d'analyse qui est traversée par une source lumineuse excitatrice (LASER) (Schéma 25).

Le cytomètre en flux permet d'obtenir trois types d'informations sur chaque cellule traversant la chambre d'analyse. Le cytomètre renseigne sur, *i*) la taille relative de la cellule (Forward Scatter, FSC) qui est évaluée à partir de la diffraction aux petits angles de la lumière incidente, *ii*) la complexité relative de la cellule (Side Scatter, SSC) c'est à dire sur son degré de complexité interne (nombre et taille des organites, rapport nucléo-cytoplasmique,...) qui est appréciée à partir de la diffraction aux grands angles de la lumière incidente, *iii*) l'intensité de la fluorescence relative de la cellule qui est obtenue après excitation de marqueurs fluorescents ou fluorochromes, fixés à la cellule et qui réémettent des photons d'une longueur d'onde supérieure à celle de la lumière incidente.

Les informations recueillies sont la conséquence de l'émission, par la cellule excitée, de signaux optiques qui sont récupérés par différents détecteurs (photomultiplicateurs) spécifiques d'une longueur d'onde donnée. Les photomultiplicateurs convertissent alors les photons captés en électrons puis en signaux numériques analysables sur un ordinateur à l'aide du logiciel (FACSDiva, BD Biosciences). L'ordinateur mémorise toutes les données individuelles et dans l'ordre de passage de chaque cellule.

Le cytomètre-trieur utilisé dans le cadre de cette thèse est un cytomètre-trieur FACSARIA (BD Biosciences) qui possède 3 sources d'excitation LASER : un LASER violet (longueur d'onde d'excitation de 407 nm), un LASER bleu (longueur d'onde d'excitation de 488 nm), un LASER rouge (longueur d'onde d'excitation de 633 nm). La puissance de l'analyse par un cytomètre-trieur FACSARIA est liée au fait que la mesure de l'émission de fluorescence est réalisée à très grande vitesse, qu'elle est individualisée et multiparamétrique. Ainsi, jusqu'à 13 paramètres de fluorescence en plus du SSC et du FSC peuvent être analysés pour chaque cellule de l'échantillon.

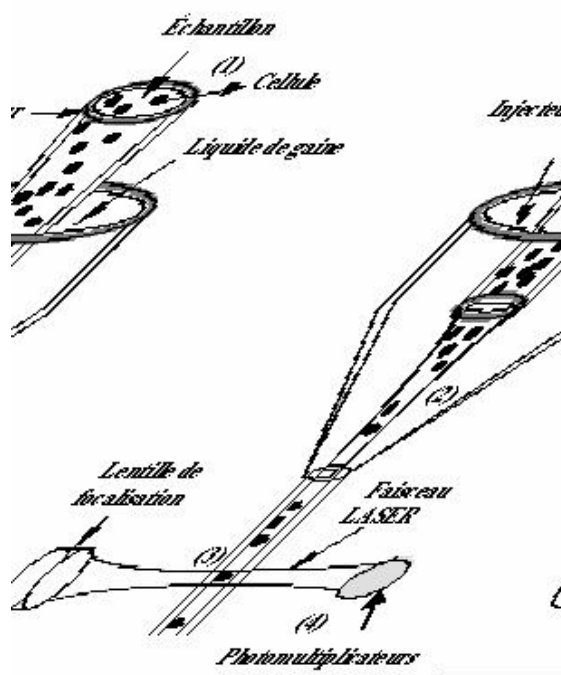


Schéma 25 : schéma du principe de l'analyse cellulaire par un cytomètre en flux
(d'après www.cytometry.be/Cours2002/COURSNAM.pdf, 2007).

1. La suspension cellulaire est lentement injectée au centre d'un flux de liquide (liquide de gaine)
2. La création d'une mince veine porteuse dans le liquide de gaine contraint les cellules à s'aligner les unes derrière les autres : c'est la focalisation hydrodynamique
3. Le jet de liquide, à l'air libre, croise un faisceau LASER qui excite les cellules les unes après les autres
4. Les signaux lumineux émis par les cellules sont transmis et captés par des photomultiplicateurs.

2. Analyse de la pureté des monocytes isolés par élutriation à contre-courant

2.1. Préparation des cellules

Afin d'analyser la pureté et la viabilité des monocytes obtenus à la suite de l'élutriation à contre-courant, nous avons réalisé un double marquage avec *i)* des anticorps monoclonaux anti-CD14 humain couplé à l'isothiocyanate de fluoresceine (FITC) (ë excitation max = 495 nm, ë émission max = 519 nm) (BD Biosciences) d'une part et d'autre part avec *ii)* de l'iodure de propidium (IP) (1µg/mL) (ë excitation max = 370 nm, ë émission max = 631 nm) (Sigma-Aldrich).

Les cellules (10^6) ont été incubées, selon le protocole de BD Biosciences, 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière puis lavées 2 fois avec du PBS 1x, par centrifugation à 400 g pendant 10 min à + 4°C. Les cellules sont alors resuspendues dans 500 µL de PBS.

2.2. Analyse des populations cellulaires

Nous avons dans un premier temps déterminé les propriétés de dispersion des monocytes par une représentation graphique de la taille relative des cellules (FSC) en fonction de leur complexité relative (SSC) (Schéma 26 A). Ensuite, nous avons analysé la viabilité de ces cellules par l'analyse du pourcentage de cellules fluorescentes en IP (Schéma 26 B). Sur cet histogramme la population P2 représente le pourcentage de cellules en nécrose. En effet, l'IP a la propriété de pénétrer dans les cellules en nécrose où il s'intercale alors à l'ADN et devient fluorescent permettant ainsi la discrimination des cellules mortes.

Enfin, nous avons analysé la pureté des monocytes grâce à un histogramme de la fluorescence FITC (Schéma 26 C). Sur cet histogramme la population P3 représente le pourcentage de cellules exprimant le marqueur CD14. Dans la fraction monocyttaire issue d'une élutriation à contre-courant, le CD14 est un marqueur spécifique des monocytes.

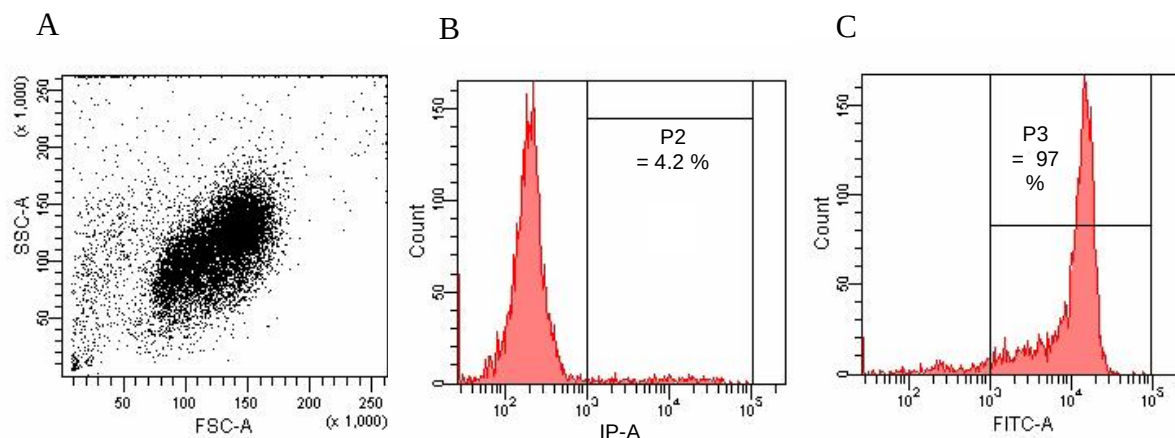


Schéma 26 : (A) Représentation bi-paramétrique de la taille (FSC) en fonction de la complexité (SSC) des monocytes. (B) Histogramme de l'intensité de fluorescence IP. (C) Histogramme de l'intensité de fluorescence FITC.

Seules les fractions monocytaires pures et viables à plus de 95 % ont été utilisées pour la suite de nos expérimentations.

3. Tri cellulaire des lymphocytes T CD3⁺CD4⁺ par cytométrie en flux

3.1. Préparation des cellules

Pour préparer les cellules au tri cellulaire par cytométrie en flux, 100×10^6 lymphocytes, issues du LymphoprepTM, ont été marqués avec 2 anticorps couplés à 2 fluorochromes différents :

- un anticorps anti-CD3 humain couplé à la phycoerythrine (PE) (ë excitation max = 480 nm, ë émission max = 578 nm) (BD Biosciences);
- un anticorps anti-CD4 humain couplé à l'allophycocyanine (APC) (ë excitation max = 595 nm, ë émission max = 660 nm).

De plus, de l'IP (1 µg/mL) a été ajouté sur les cellules afin d'analyser la viabilité cellulaire. Les lymphocytes ont été incubés 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière puis lavés 2 fois avec du PBS 1x par centrifugation à 400 g pendant 10 min à + 4°C. Ensuite, les cellules sont resuspendues dans du PBS à la concentration de 10×10^6 cellules/mL et filtrées dans un filtre de 70 µm afin de supprimer les agrégats cellulaires.

3.2. Analyse des populations cellulaires

Nous avons dans un premier temps déterminé les propriétés de dispersion des lymphocytes par une représentation graphique de la taille relative des cellules (FSC) en fonction de leur complexité relative (SSC). La population homogène principale a été sélectionnée pour la suite de l'analyse (population P1) (Schéma 27).

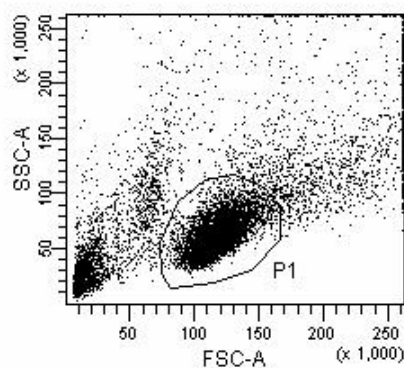


Schéma 27 : Représentation bi-paramétrique de la taille (FSC) en fonction de la complexité (SSC) des cellules de la fraction lymphocytaire d'élutriation.

Ensuite, l'analyse de la fluorescence du IP de la population P1 a été réalisée afin d'éliminer les cellules en nécrose. Nous avons alors sélectionné la population P2 pour la suite de l'expérimentation (Schéma 28).

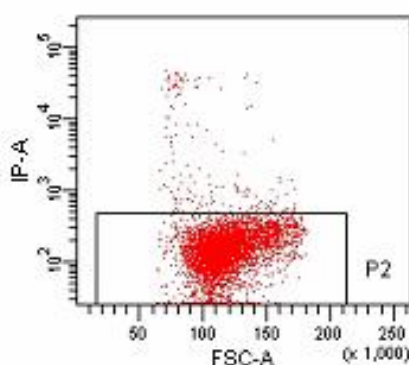


Schéma 28 : Représentation bi-paramétrique de la taille (FSC) en fonction de la fluorescence de Iodure de propidium (PI) des cellules de la population P1.

Finalement, les propriétés de fluorescence des cellules vivantes ont été déterminées par des représentations bi-paramétriques de l'intensité de la fluorescence APC en fonction de l'intensité de fluorescence PE. La population doublement marquée PE/APC représente la population lymphocytaire CD3+CD4+ à trier (Schéma 29).

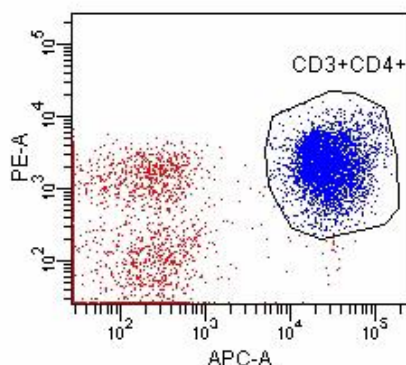


Schéma 29: Représentation bi-paramétrique de l'intensité de fluorescence APC en fonction de l'intensité de fluorescence PE des cellules de la population P2.

3.3. Principe du tri cellulaire par cytométrie en flux

Une fois les populations cellulaires analysées, il est possible de les trier, c'est-à-dire de les séparer physiquement les unes des autres en fonction des caractéristiques déterminées lors de l'analyse. Ce tri est réalisé grâce au fractionnement du jet liquide contenant les cellules. Ce jet va se rompre, à un point précis (point de rupture), pour donner des gouttes caractérisées par leur position et leur moment d'apparition. Lors de l'analyse, le programme de tri décide si la cellule doit être isolée ou non selon les critères définis par l'utilisateur. Si une cellule d'intérêt devant être triée est détectée, le cytomètre charge électriquement le jet au moment de la formation de la goutte contenant cette cellule. Les gouttes chargées, contenant une cellule à trier, passent entre des plaques de déflexion fortement chargées, et sont déviées du côté de la plaque de polarité opposée, puis collectée dans un tube. En revanche, les gouttes ne contenant pas de cellule d'intérêt, ne sont pas chargées donc elles ne sont pas déviées par les plaques de déflexion et tombent, par gravité, dans une poubelle (Schéma 30). En appliquant différents niveaux de charge, il est possible de trier quatre populations simultanément sur le cytomètre-trieur FACS Aria.

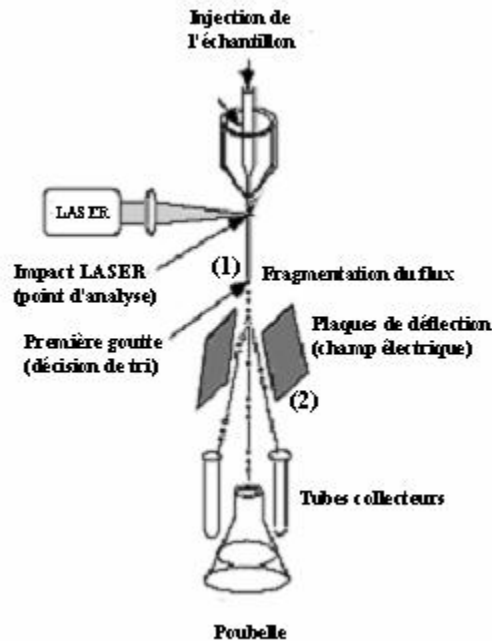


Schéma 30 : Schéma du principe du tri cellulaire

(d'après www.cytometry.be/Cours2002/COURSNAM.pdf, le 16/09/2007).

1. Fragmentation contrôlée du flux de liquide qui conduit à l'emprisonnement de chaque cellule dans une goutte. Après l'analyse et dans un délai défini par le trieur, la décision de charger électriquement chaque goutte contenant une cellule viable répondant aux critères définis par l'utilisateur sera prise.
2. Déviation, par un champ électrique constant, des gouttes chargées de leur chute initiale et récupération des gouttes contenant une cellule d'intérêt dans des tubes collecteurs.

3.4. Tri des lymphocytes T $CD3^+CD4^+$

Une fois la population lymphocytaire T $CD3^+CD4^+$ sélectionnée, le tri est réalisé avec une vitesse de passage des cellules réglée entre 4000 et 5000 cellules/seconde. La chambre de prélèvement de l'échantillon est refroidie à $+4^\circ\text{C}$ le temps du tri afin de minimiser la mort cellulaire. A la fin du tri, la pureté des populations cellulaires est contrôlée par une ré-analyse en cytométrie en flux (Schéma 31).

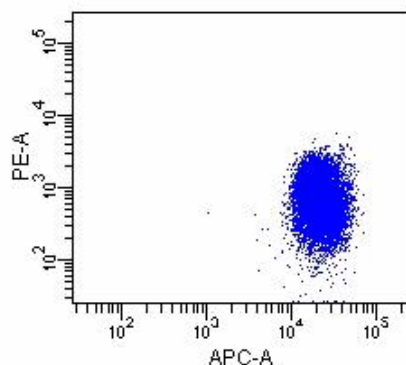


Schéma 31 : Représentation bi-paramétrique de l'intensité de fluorescence APC en fonction de l'intensité de fluorescence PE des cellules issues des tubes collecteurs après le tri cellulaire.

Résultats

1^{ère} partie : Rôle des peptides d'élastine dans la régulation de la production de cytokines inflammatoires par les monocytes humains activés par le LPS.

Les cellules immunitaires communiquent entre elles et contrôlent l'inflammation via la production de cytokines. La production de cytokines pro-inflammatoires tels que le TNF- α , l'IL-1 α ou l'IL-6 permet d'initier, d'entretenir et d'amplifier la réponse inflammatoire alors que la production de cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF- β) est nécessaire pour contrôler et finaliser cette réponse. Lors des pathologies inflammatoires chroniques cet équilibre entre les cytokines pro- et anti-inflammatoire est rompu.

Les monocytes sont des acteurs majeurs de la réaction inflammatoire. Ils interviennent par la production de molécules biologiquement actives parmi lesquelles les cytokines ont un rôle clé. Lorsque la pathologie inflammatoire se situe dans un tissu riche en fibres élastiques, des produits de dégradation de l'élastine sont générés. Ces peptides d'élastine exercent des nombreuses activités biologiques sur différents types cellulaires et notamment sur les monocytes.

Des études antérieures ont mis en évidence la capacité des peptides d'élastine *i)* à orienter la réponse lymphocytaire T vers un profil de sécrétion de cytokines de type Th-1, et, *ii)* à moduler la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β par les cellules de mélanomes. Sur la base de ces résultats, nous avons étudié le rôle des peptides d'élastine sur la régulation de l'expression des cytokines pro- et anti-inflammatoires par les monocytes humains et nous sommes intéressés aux voies de signalisation impliquées dans les mécanismes de régulation.

Ce travail a fait l'objet d'une publication récente dans *The Journal of Immunology* avec le titre "Elastin receptor (S-gal) occupancy by elastin peptides counteracts pro-inflammatory cytokine expression in LPS-stimulated human monocytes through NF- κ B down-regulation".

Elastin receptor (S-gal) occupancy by elastin peptides counteracts pro-inflammatory cytokines expression in LPS-stimulated human monocytes through NF- κ B down-regulation

Thomas Baranek,^{1*} Romain Debret,^{2†} Frank Antonicelli,[†] Bouchaib Lamkhioued,^{*} Azzaq Belaaouaj,[‡] William Hornebeck,[†] Philippe Bernard,[†] Moncef Guenounou,^{*} and Richard Le Naour^{3*}

^{*} Laboratoire d'Immunologie et de Microbiologie, IPCM, EA3796, IFR53, UFR de Pharmacie, Reims, France

[†] Laboratoire de Biochimie et de Dermatologie, CNRS UMR 6198, IFR53, UFR de Médecine, Reims, France

[‡] Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche Santé 514, IFR53, Centre Hospitalier Universitaire Maison Blanche, Reims, France

Running Title: Elastin peptides down-regulate pro-inflammatory cytokines

Keywords: Monocytes/Macrophages, Antigens/Peptides/Epitopes, Cytokines, Transcription factors, Inflammation

Abstract

In inflammatory diseases, strong release of elastinolytic proteases results in elastin fibers degradation generating elastin peptides (EPs). Chemotactic activity for inflammatory cells was, among wide range of properties, the former identified biological activity exerted by EPs. Recently, we demonstrated the ability of EPs to favour a Th-1 cytokine (IL-2, IFN- γ) cell response in lymphocytes and to regulate IL-1 β expression in melanoma cells. We hypothesized that EPs might also influence inflammatory cells properties by regulating cytokines expression by these cells. Therefore, we investigated the influence of EPs on inflammatory cytokines synthesis by human monocytes. We evidenced that EPs down-regulated both at the mRNA and protein levels, the pro-inflammatory TNF- α , IL-1 β and IL-6 expression in LPS-activated monocytes. Such negative feed-back loop could be accounted solely for EPs-mediated effects on pro-inflammatory cytokine production since EPs did not affect anti-inflammatory IL-10 or TGF- β secretion by LPS-activated monocytes. Furthermore, we demonstrated that EPs effect on pro-inflammatory cytokine expression by LPS-stimulated monocytes could not be due neither to a decrease of LPS receptor expression nor to an alteration of LPS binding to its receptor. The inhibitory effects of EPs on cytokine expression were found to be mediated by receptor (S-gal) occupancy, as being suppressed by lactose, and to be associated with the decrease of NF- κ B-DNA complex formation. As a whole, these results demonstrated that EPs/S-gal interaction on human monocytes down-regulated NF- κ B-dependent pro-inflammatory cytokine expression and pointed out the critical role of EPs in the regulation of inflammatory response.

Introduction

The inflammatory process is tightly regulated involving both signals that initiate and maintain inflammation, and signals that pull such process down. An imbalance between these two signaling pathways results in uncontrolled inflammation, leading to cellular and tissue damage. Monocytes are main players in the initiation, maintenance, and resolution of inflammation, notably through secretion of several biologically active molecules among which cytokines play a pivotal function. During inflammation, monocytes produce pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6 and TNF- α (1, 2); which is followed by anti-inflammatory cytokines secretion as IL-10 and TGF- β to keep the progression of inflammation under control (3, 4).

Such timely regulated process, corresponding to the initiation and resolution phases of inflammation, has been delineated in many human diseases (5). In pathologies involving elastin-rich tissues as artery, lung and skin, inflammation is concomitant with important elastolysis, leading to elastin peptides (EPs) generation (6-8). In those pathologies, a direct relationship between inflammation and EPs levels has been established. Indeed, release by inflammatory cells of cytokines such as IL-1 β and TNF- α , which both activate the NF- κ B pathway, enhance matrix metallo-proteinases expression (9, 10, 11) some of them displaying potent elastolytic activity (12-14). Besides, release of elastolytic proteases, i.e. elastase and proteinase-3, by polymorphonuclear neutrophils has been observed following gram-negative bacteria infection (15). Recent investigation evidenced that these enzymes could liberate from hydrolysis of human elastin, VGVAPG-containing fragments (16). Such elastin peptides further designated as elastokines, trigger several biological activities.

EPs exhibit a wide range of properties such as i) chemotactic activity for monocytes, fibroblasts and tumor cells (17-19) ii) regulation of cell proliferation in normal and pathological conditions (20) and iii) control of vascular tone (21). These effects are largely

mediated through interaction of EPs with a receptor complex which includes a 67-kDa elastin-binding protein (EBP) identified as an enzymatically inactive spliced variant of human β -galactosidase designated as Spliced-galactosidase (S-gal) (22, 23, 24). Besides its elastin binding site, EBP also contains a β -galactosugar binding site whose binding causes its shedding from the cell surface (25) and therefore elastin receptor inactivation. Although this receptor is expressed at the surface of various cell types including immune and inflammatory cells (26, 27), the observed effects following elastin/receptor interaction are dependent on cell type and therefore on the triggering of specific signaling cascade(s). For instance, activation of protein kinase G, cAMP or cGMP by EPs was reported to induce chemotaxis of monocytes (28-30). Besides, activation of pertussis toxin-sensitive G-proteins and MEK/ERK signaling cascade were involved in EPs-mediated effects on cell proliferation as observed in arterial smooth muscle cells and fibroblasts (31, 32). In turn, S-gal occupancy by EPs led to the activation of both NF- κ B and p38 in melanoma cells (33).

In previous studies, we showed the ability of EPs to orientate cytokine expression in human lymphocytes towards a Th-1 profile (27), and to interfere on pro-inflammatory cytokine production in human melanoma cells (33). Based on these former results, we hypothesized that, subsequently to elastin fiber degradation in pathologies displaying an inflammatory reaction, EPs could interfere in the sustained inflammation through the regulation of pro- and/or anti-inflammatory cytokine expression. To that purpose, we here used LPS-activated human monocytes as a classical inflammatory model system, and showed that LPS-enhanced pro-inflammatory cytokines expression was down-regulated following EPs interaction with its receptor. Inhibition of pro-inflammatory cytokines expression upon EPs treatment was associated with inhibition of NF- κ B pathway. Similarly, IL-1 β -mediated stimulation of NF- κ B could be prevented by EPs in melanoma cells in culture.

Materials and methods

Reagents

LPS from *E.coli* 0111:B4, VGVAPG, brefeldin A, lactose, FITC-LPS from *E.coli* 0111:B4 and mouse monoclonal anti-human β -actin (IgG1, clone AC-15, catalogue number A5441) were purchased from Sigma-Aldrich. The scrambled VVGPGA peptide, not found in tropoelastin sequence, was synthesized by GENEPEP. RPMI 1640 medium, McCoy's 5A medium, FCS, L-glutamine, penicillin, streptomycin, PBS, ethidium bromide, reverse transcriptase, and all primers and probes were obtained from Invitrogen. SYBR Green for real-time RT-PCR was purchased from Applied Biosystems. FACS Lysing, FACS Permeabilizing, mouse FITC-conjugated anti-human CD14 (IgG2a, clone M5E2, catalogue number 555397), mouse PE-conjugated anti-human IL-1 β (IgG1, clone AS10, catalogue number 340516), rat PE-conjugated anti-human IL-6 (IgG1, clone MQ2-13A5, catalogue number 554545), mouse allophycocyanin (APC)-conjugated anti-human TNF- α (IgG1, clone Mab11, catalogue number 340534) and corresponding isotype controls were from BD Pharmingen. Elastin-FITC was obtained from Elastin Products Company. Mouse PE-conjugated anti-human TLR4 (IgG1, clone HTA125, catalogue number sc-13593), rabbit polyclonal antibody against human p50 NF- κ B subunit (catalogue number sc-114X), non-specific IgG (catalogue number sc-2027), and rabbit polyclonal antibody against human PKC α (catalogue number sc-208) were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Rabbit anti-human Thr180/Tyr182-phosphorylated p38 MAP Kinase (catalogue number 9211), and rabbit anti-human I κ B- α (catalogue number 9242) antibodies were provided by Cell Signaling Technology. Rabbit polyclonal antibodies against human PKC β II (catalogue number 539605) and PKC δ (catalogue number 539607) isoenzymes were purchased from Calbiochem.

Human peripheral blood monocytes isolation and culture

Human peripheral blood monocytes were obtained under sterile and endotoxin-free conditions by counter-current centrifugal elutriation (service of haematology, Reims Hospital) followed by density-gradient centrifugation from heparinized venous blood of healthy consenting donors, after protocol approval by the Ethical Committee of Reims Hospital. Isolated human monocytes ($1 \times 10^6/\text{ml}$) were cultured at 37 °C in 5 % CO₂ under adherence-free conditions in Teflon wells and in RPMI 1640 medium containing L-glutamine (2 mM), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml) and 10 % heat-inactivated FCS (complete medium). For experiments, human monocytes were shown to be > 98% by FACS analysis (not shown) and cell viability was over 95% as determined by trypan blue exclusion.

Treatment of human monocytes

Human monocytes cultured under experimental conditions above indicated were harvested, washed, and seeded onto Teflon wells at $1 \times 10^6/\text{ml}$ in a serum-starved complete medium and incubated with LPS (1 µg/ml) in the presence or not of VGVAPG elastin peptide (10 µg/ml) or scrambled VVGPGA peptide (10 µg/ml). At 1 or 4 h following incubation at 37°C in 5% CO₂, cells were either collected for intracellular cytokine staining, CD14 and TLR-4 surface staining, or total RNA. Cell culture supernatants were also collected for quantification of cytokine protein level by ELISA. In Western blotting experiments, human monocytes were collected for protein extraction at 15, 30 and 60 min following incubation with LPS in the presence or not of VGVAPG. EMSA and ChIP analysis were performed at 60 min following incubation. Cell viability was more than 95% when cells or cell culture supernatants were collected. To detect intracytoplasmic cytokines, brefeldin A (5 µg/ml) was added to the culture medium (34). In some experiments, LPS or Elastin binding on human monocytes was determined following 4 h incubation of cells with VGVAPG or LPS alone, respectively. Pre-

treatment of monocytes with 10 mM lactose (3 hr) was used to appreciate the specificity of EPs effects.

Melanoma cell line culture and treatment

Melanoma cell line M₃Da was established from metastases of a patient with malignant melanoma and has been previously characterized. A total of 20,000 M₃Da cells per cm² were initially seeded in plastic plates and grown as monolayer cultures in McCoy's 5A medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS at 37°C in 5% CO₂ until 80% confluence. Cells were then washed twice with serum-starved McCoy's 5A medium prior treatment with IL-1β

was performed on a logarithmic scale using CellQuestTM software (BD Biosciences). Surface staining for TLR-4 receptor was performed, as described above, using PE-conjugated anti-TLR-4 mAb. In some experiments, LPS or Elastin binding on human monocytes was determined following 20 min incubation of cells with 1 µg/ml LPS-FITC or 10 µg/ml Elastin-FITC, respectively. Cells were then washed twice and resuspended in 500 µl PBS containing 1% PFA, and stored in the dark at 4°C until analysis.

Confocal microscopy

Human monocytes (1×10^6) were incubated at 37 °C for 20 min in the dark with 10 µg/ml Elastin-FITC in PBS containing 1% BSA. After incubation, cells were washed twice in PBS to remove excess dye and then resuspended in PBS. In some experiments, monocytes were pre-incubated with 10 mM lactose for 3 h to remove EBP. Fluorescence emission was recorded over 520 nm for FITC using a laser scanning confocal microscope (BioRad MRC-1024ES) coupled to an Olympus IX70 microscope.

RT-PCR analysis

Total RNA was extracted from 5×10^6 monocytes using NucleoSpin[®] RNA II (Macherey-Nagel) in accordance with the Macherey-Nagel technical data sheets and analysed on agarose gels stained with ethidium bromide. One µg of Total RNA was reverse-transcribed into cDNA with a reverse transcriptase using SuperScriptTM First-Strand Synthesis System in accordance with the Invitrogen technical data sheets. After reverse transcription, the cDNA product was amplified by PCR as previously described (35). Primer sequences for GRO-α, IL-8, S-gal and for the internal controls 18S and β-actin were as follows: GRO-α sense 5'-ACTGAACTGCGCTGCCAGTG-3'; GRO-α antisense 5'-GGCATGTTGCAGGCTCCTCA-3'; IL-8 sense 5'-ATTTCTGCAGCTCTGTGTGAA-3'; IL-8 antisense 5'-TGAATTCTCAGCCCTCTTCAA-3'; S-gal sense 5'-CCATCCAGACATTACCTGGCA-3'; S-gal

antisense 5'-GATGTTGCTGCCTGCACTGTT-3'; 18S sense 5'-GCGAATTCCTGC CAGTAGCATATGCTTG-3'; 18S antisense 5'-GGAGCTTAGAGGAGCGAGCG ACCAAAGG-3'; β -actin sense 5'-TGCTATCCAGGCTGTGCTA-3'; β -actin antisense 5'-ATGGAGTTGAAGGTAGTTT-3'. PCR amplifications of cDNA were performed under the following conditions: Initial DNA denaturation for 10 min at 94°C, primer annealing at 58°C (β -actin) or 62°C (GRO- α , IL-8, S-gal) or 65°C (18S) for 1 min and extension at 72°C for 1 min, for a total 40 cycles. The ethidium bromide-stained amplified cDNA obtained by RT-PCR were analysed from 1.5% agarose gels under U.V. light (Gel Doc 2000, Biorad). The PCR products for GRO- α , IL-8 and S-gal were analysed comparatively to the amount of the β -actin or 18S housekeeping gene detected in the same mRNA sample.

In some experiments, real-time RT-PCR analysis was used. Using this approach, the mRNA levels for TNF- α , IL-1 β , IL-6 and β -actin were determined with the 7000 sequence detection system ABI Prism sequence detector (Applied Biosystems), using the double-strand-specific SYBR Green (Applied Biosystems) dye system. All reactions were performed according to the following thermal profile: denaturation at 95°C for 15 seconds, annealing and extension at 60°C for 1 min (data collection was performed during the annealing/extension step). Primer sequences for TNF- α , IL-1 β , IL-6 and for the internal control β -actin were determined with Primer Express software (Applied Biosystems) and were as follows: TNF- α forward 5'-GAGACCAGGGAGCCTTTGGT-3'; TNF- α reverse 5'-TTGTGTCAATTTCTAGGTGAGGTCTT-3'; IL-1 β forward 5'-TAAAGCCCGCCTGACAGAA-3'; IL-1 β reverse 5'-ATAGGGAAGCGTTGCTCATC-3'; IL-6 forward 5'-ACTTAAGCCAGGGTTTCTCATATGTTA-3'; IL-6 reverse 5'-CAC CCGAGGCTTGCTAAGTC-3'; β -actin forward 5'-AAATGCTTCTAGGCGGACTATGA-3'; β -actin reverse 5'-TGTTTTCTGCGCAAGTTAGGTTT-3'. Data analysis was performed with

the SDS software (Applied Biosystems). Results are presented as ratios between the target gene mRNA and the β -actin mRNA.

Detection of cytokine concentration

Determination of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 in cell culture supernatants of human monocytes were performed in duplicate using commercially available high-sensitivity ELISA kit (Quantikine, R&D Systems) according to the manufacturer's instructions. The sensitivity of each ELISA kits was 4.4 pg/ml, 1.5 pg/ml, 0.70 pg/ml and 3.9 pg/ml for TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 respectively.

Chromatin ImmunoPrecipitation analysis (ChIP)

Human monocytes were fixed with 1% formaldehyde, neutralized with glycine for 5 min to a final concentration of 125 mM, rinsed twice with TBS (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.1) and then syringed with TBS containing 0.5% SDS. The cell pellet was resuspended in the same buffer completed with 2% Triton X-100. The cell pellet was sonicated to yield DNA fragments of ~400 bp in average, immunoprecipitated with 1 μ g of antibodies: rabbit anti-p50 NF- κ B subunit polyclonal Ab and rabbit anti-IgG antibody as negative control, or no antibody as positive control (inputs), this last tube being conserved at 4°C until DNA isolation step. For the other tubes, after overnight incubation at 4°C with continuous mixing, aggregates were removed by centrifugation and protein-A beads were added to supernatant. After 2 h at 4°C, immune complexes were collected by centrifugation at 4°C and washed three times with wash buffer containing 150 mM NaCl, 20 mM Tris (pH 8.1), 5 mM EDTA (pH 8), 6% sucrose, 0.2% NaN₃, 1% Triton X-100, 0.2% SDS, and twice with solution containing 1 mM EDTA, 50 mM HEPES (pH 7.5), 500 mM NaCl, 1% triton X-100, 0.2% NaN₃, 0.1% deoxycholic acid, and twice with LiCl detergent solution (10mM Tris (pH 8), 1mM EDTA (pH 8), 250 mM LiCl, 0.2% NaN₃, 0.5% NP-40, 0.5% deoxycholic acid), and finally in TE buffer. All

washes were 5 min at 4°C with mixing. To eluate immune complexes from beads, incubation for 30 min at 65°C in reversal buffer (1% SDS, 100 mM NaHCO₃) was done. Eluate was then incubated overnight at 65°C in the same buffer to reverse cross-links. DNA was extracted with phenol-chloroform and precipitated with ethanol using glycogen as a carrier. The purified DNA isolated by immunoprecipitation was analysed by PCR. The human TNF- α mRNA (GenBank® accession number NM_000594) was aligned against the overlapping genomic sequence (GenBank® accession numbers NC_000006.10), which map to chromosome 6p21.3. The promoter sequence was identified from alignment and annotated relatively to the translation start site. Primers encompassing the three κ B sites located at -1058, -822, and -793 were then designed, using Vector NTI ® v10 (Invitrogen). The sequence of the primers were: (sense) 5'-GCAATGGGTAGGAGAATGTC-3', and (antisense) 5'-CAAACACAGGCCTCAGGACT-3'. PCR amplifications of cDNA were performed under the following conditions: Initial DNA denaturation for 10 min at 94°C, primer annealing at 62°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min, for a total 40 cycles.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Nuclear extracts were prepared from human monocytes or melanoma cells as already described (36). Briefly cells were lysed in 400 μ l of buffer A (10 mM HEPES, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.4 mM PMSF, 0.2 mM NaF, 0.2 mM Na₃VO₄, and 1 μ g/ml leupeptin) to which was added 25 μ l of buffer B (10% Nonidet P-40), and the nuclei were collected by centrifugation (13,000 g, 20 s). Nuclei were resuspended in 50 μ l of buffer C (50 mM HEPES, 50 mM KCl, 10 % glycerol, 0.2 mM NaF, and 0.2 mM Na₃VO₄) and stirred for 20 min at 4°C, followed by centrifugation (10,000 g, 5 min). Nuclear proteins (4 μ g) were incubated with 5X binding buffer (50 mM Tris-HCl, 0.5 M KCl, 5 mM EDTA, 2.5 mM MgCl₂, 40 % glycerol) and (γ -³²P)adenosine 5' triphosphate-labeled probes and submitted to electrophoresis on a 6 % nondenaturing polyacrylamide gel. Gel shift

experiments were performed on both NF- κ B consensus sequence and TNF- α promoter (GenBank® accession numbers NC_000006.10). DNA binding on NF- κ B oligonucleotides was assessed by autoradiography. Sequences of probes have been synthesized as follows: NF- κ B consensus oligonucleotides 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'; NF- κ B specific probe for DNA binding on TNF- α DNA 5'-GCTCATGGGTTTCTCCA-3'. In competition experiments, the nuclear extract was incubated with a 50-fold molar excess of the appropriate unlabeled specific and non specific competitor oligonucleotides. In super-shift studies, a rabbit anti-p50 NF- κ B subunit polyclonal antibody, or a non-specific IgG was pre-incubated with the crude nuclear extract for 1 h at room temperature before addition of the labelled probe.

Determination of I κ B- α and phospho-p38 expression.

Human monocytes were rinsed twice in ice-cold PBS and incubated on ice for 30 min with lysis buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCL, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.2 mM NaF, 0.2 mM Na₃VO₄, 1% Triton X-100, and 0.5% Nonidet P-40) containing a mini-complete protease inhibitor mixture tablet (Roche Diagnostic Systems). Extracts were clarified at 12,000 g at 4°C for 5 min, and protein concentration was determined using the Bradford assay (Bio-rad). With the use of one-dimensional SDS-PAGE, 30 μ g of proteins extracts were resolved and electrophoretically transferred to Trans-Blot Transfert Nitrocellulose membrane (0.45 μ m) (Bio-rad). Membranes were blocked using 5% non-fat dry milk in TBST (0.05% Tween 20, 10 mM TBS, pH 7.5) for 1 h at room temperature and then washed twice for 10 min with TBST. Membranes were then incubated overnight at 4°C with antibodies raised against I κ B- α (1/1000^e), Thr180/Tyr182-phosphorylated p38 MAP Kinase (1/1000^e), or β -actin (1/1000^e). Membranes were subsequently washed twice with TBST and incubated at room temperature for 1 h with the horse radish peroxidase-conjugated donkey anti-mouse

(1/5000^e) or goat anti-rabbit (1/5000^e) immunoglobulin G antibodies used as secondary antibodies. The bound secondary antibodies were detected using the Luminol Chemiluminescence detection kit (Santa Cruz). The signal was visualized on hyperfilm ECL (Amersham Biosciences).

Determination of PKC isoenzymes

The cytosolic fractions were prepared by lysis of the human monocytes in 400 µl of buffer A (10 mM HEPES, 10 mM KCL, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.4 mM PMSF, 0.2 mM NaF, 0.2 mM Na₃VO₄, and 1 µg/ml leupeptin) to which was added 25 µl of buffer B (10% Nonidet P-40), and collected by centrifugation (13,000 g, 20 s). The remaining protein pellets were treated with the same lysis buffer supplemented with 1% Triton X-100 to obtain the membrane fractions. Protein concentrations were measured using the Bradford assay (Bio-Rad). Proteins were then acetone precipitated during 4 h at -20°C, boiled in Laemmli buffer for 10 min at 100°C, separated on 8% SDS-PAGE gel, and transferred to PVDF membranes (Millipore). Membranes were then blocked 1h in PBS with 5% (w/v) dry milk, and probed at 4°C overnight with the polyclonal primary antibodies specific to PKCα, PKCβII, PKCδ isoenzymes (1/1000^e), or β-actin (1/1000^e). Membranes were subsequently incubated for 1 h with the horse radish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulins used as secondary antibodies (1/5000^e). The immunoreactive bands were visualized by a chemiluminescent detection using the Amersham ECL Western blotting system (Amersham).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using a Wilcoxon nonparametric test. *p* values of less than 0.05 were considered to be statistically significant.

Results

EPs decrease LPS-induced pro-inflammatory cytokine production in human monocytes

In keeping with the presence of S-gal on human monocytes (26, 37), we first investigated whether EPs, i.e. VGVAPG, could interfere with cytokine production by monocytes. To that purpose, human monocytes isolated by counter-current centrifugal elutriation were incubated for 4 h with VGVAPG (10 µg/ml) and/or LPS (1 µg/ml), then TNF- α , IL-1 β and IL-6 intracellular expressions were determined by flow cytometry. On untreated monocytes, VGVAPG alone had no effect on TNF- α , IL-1 β and IL-6 intracellular expressions (Figure 1A, blue versus green curves). We then studied the ability of VGVAPG to modulate pro-inflammatory cytokines production in human monocytes stimulated by LPS. LPS treatment increased expression of the three pro-inflammatory cytokines tested (Fig. 1A, purple versus green curves) with a stronger effect for TNF- α as compared to IL-1 β and IL-6. When LPS-stimulated monocytes were co-treated with VGVAPG, expression of cytokines was decreased compared to LPS-treated cells (Fig. 1A, red versus purple curves) whereas co-treatment with scrambled peptide (VVGPGA) had no effect (Fig. 1A, black versus purple curves). Statistical significance of this result was confirmed using six different donors (Fig 1B). Analysis of the VGVAPG inhibitory effects revealed that down-regulation of LPS-enhanced pro-inflammatory cytokines expression was either partial (TNF- α or total (IL-1 β and IL-6) as compared to untreated human monocytes. Using similar experimental conditions, we then determined by ELISA the secretion of IL-10, an anti-inflammatory cytokine known to induce a negative feed-back loop of the pro-inflammatory cytokine production in monocytes. Figure 1C shows that following 4 h treatment with LPS, IL-10 basal expression was significantly increased; co-incubation with VGVAPG did not modified its expression level.

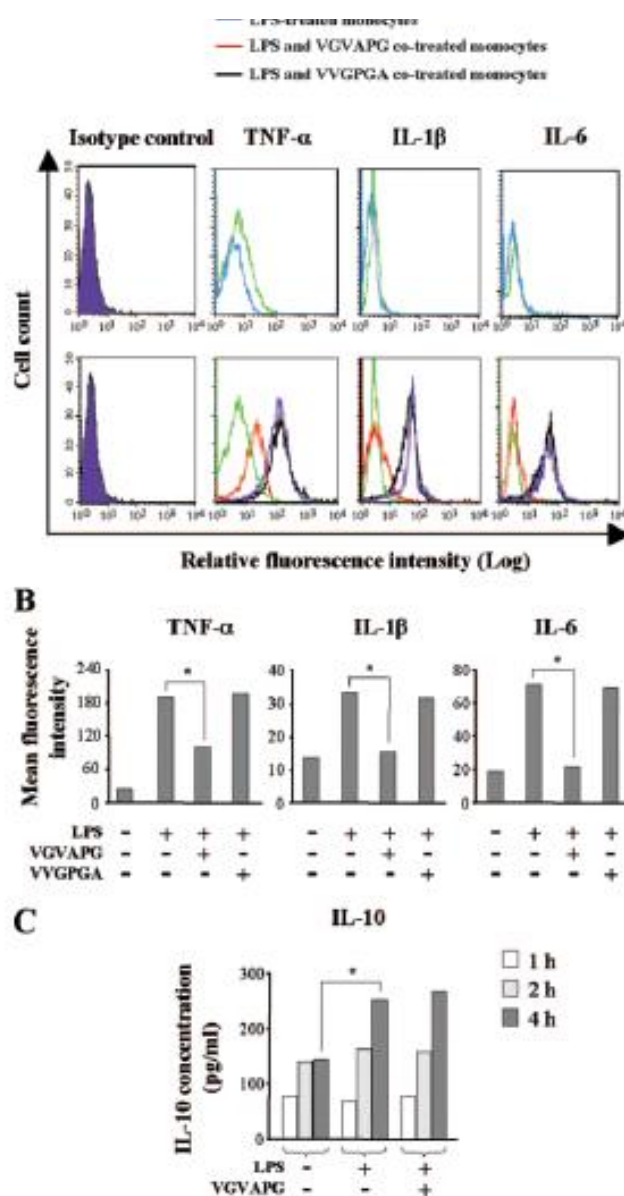


FIGURE 1. EPs decrease LPS-induced proinflammatory cytokine ex-

FIGURE 1. EPs decrease LPS-induced pro-inflammatory cytokine expression. **A**, Human monocytes were incubated with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) and/or the elastin peptide VGVAPG (10 $\mu\text{g/ml}$). The scrambled VVGPGA peptide (10 $\mu\text{g/ml}$), not found in tropoelastin sequence, was used as negative control. Four hours after incubation, TNF- α , IL-1 β and IL-6 intracellular expressions were determined by two-color flow cytometry analysis. Data are representative of six independent experiments. **B**, Statistical analysis of results obtained from the six independent experiments studying cytokine intracellular expressions upon LPS/VGVAPG or LPS/VVGPGA co-incubation was performed using a Wilcoxon nonparametric test. Data are expressed as mean fluorescence intensity. *, $p < 0.05$. **C**, Human monocytes were incubated with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) in the presence or not of VGVAPG (10 $\mu\text{g/ml}$). One, two and four hours after incubation, IL-10 secretion in cell culture supernatants was determined by ELISA. Data are representative of six independent experiments. *, $p < 0.05$ using a Wilcoxon nonparametric test.

LPS receptor expression and binding of LPS to its receptor are not affected by co-incubation with EPs

To further investigate the mechanisms involved in EPs-mediated effect on reduced LPS-stimulated cytokine expression, we then analysed whether co-treatment with VGVAPG displayed any influence on the expression of two components of LPS receptor, i.e. CD14 and TLR-4, at the monocyte cell surface (38). Flow cytometry analysis using CD14 and TLR-4 specific monoclonal antibodies revealed that treatment with VGVAPG did not alter neither CD14 nor TLR-4 expression (Fig. 2A, orange versus purple curves). Accordingly, LPS binding on monocyte surface was not modified by the presence of VGVAPG in the co-incubation medium (Fig. 2B).

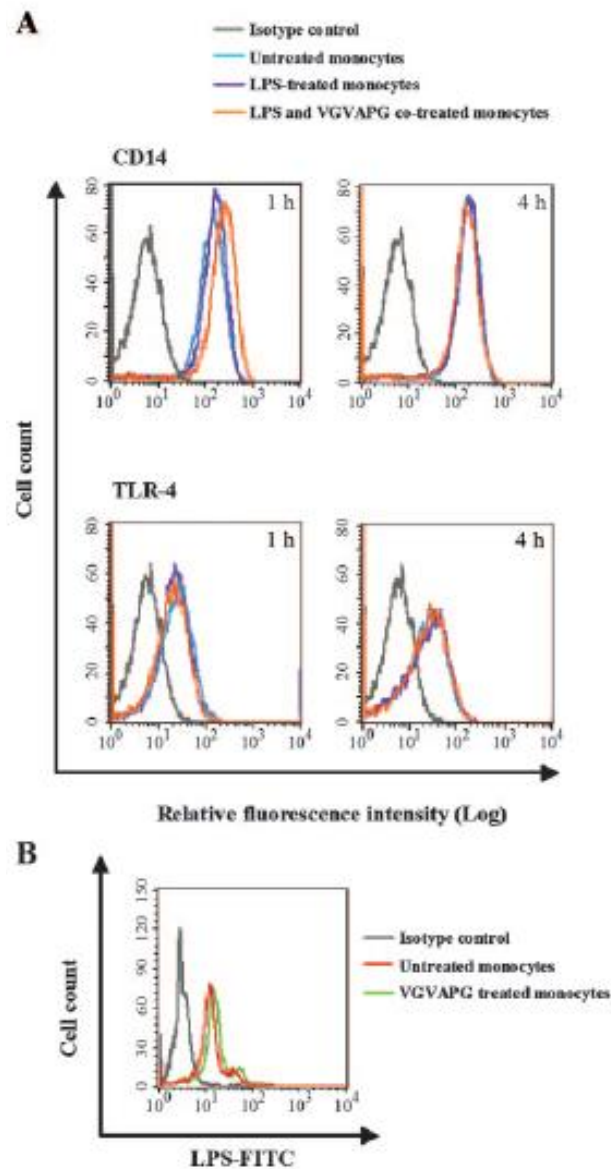


FIGURE 2. CD14/TLR-4 expression and LPS binding on human monocytes are not affected by EPs. **A**, Human monocytes were incubated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence or not of VGAPG (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). One and four hours after incubation, CD14 and TLR-4 expression levels were determined by flow cytometry analysis. Data are representative of three independent experiments. **B**, Human monocytes were incubated with LPS-FITC (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence or not of VGAPG (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Four hours after incubation, LPS binding on human monocytes was determined by flow cytometry analysis. Data are representative of three independent experiments.

Involvement of elastin receptor in LPS-induced pro-inflammatory cytokine down-regulation by EPs

The involvement of the elastin receptor (S-gal) activation by VGVAPG on the regulation of LPS-enhanced cytokine expression was further examined. To that end, we first studied the expression of S-gal and showed that human monocytes constitutively expressed S-gal mRNA, and that this expression was not affected by LPS treatment (Fig. 3A). Furthermore, comparative analysis by flow cytometry revealed that binding of elastin to its receptor was not modified by LPS co-incubation (Fig. 3B). Specificity of elastin binding to its receptor was then demonstrated by confocal microscopy using elastin-FITC on monocytes pre-treated or not with 10 mM lactose, a galactosugar known to induce the shedding of S-gal from the cell surface (25) (Fig 3C). To determine whether VGVAPG down-regulate the production of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in LPS-activated human monocytes via interaction with its receptor, cells were pre-treated with 10 mM lactose. Accordingly, the subsequent lactose-dependent elastin receptor desensitization abrogated the inhibitory effect of VGVAPG on LPS-induced pro-inflammatory cytokine production at both mRNA and protein levels (Fig. 3D).

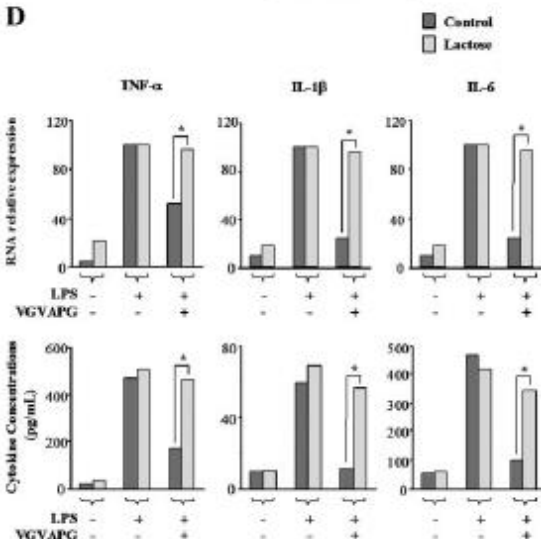


FIGURE 3. EPs/S-gal interaction down-regulates LPS-induced pro-inflammatory cytokine expression. **A**, Human monocytes were treated or not with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) for 4 h, then total RNA was extracted and S-gal and β -actin mRNA expression was determined by RT-PCR analysis. Data are representative of three independent experiments. **B**, Human monocytes were incubated 4 h with Elastin-FITC (10 $\mu\text{g/ml}$) in the presence or not of LPS (1 $\mu\text{g/ml}$). Elastin binding on human monocytes was determined by flow cytometry analysis. Data are representative of three independent experiments. **C**, Human monocytes were pre-incubated or not with lactose (10 mM) for 3 h, and then were treated 20 min with Elastin-FITC (10 $\mu\text{g/ml}$) before analysis by phase-contrast microscopy (pictures 1 and 3) coupled to laser scanning confocal microscopy (pictures 2 and 4). Data are representative of three independent experiments. **D**, Human monocytes pre-incubated or not with lactose (10 mM) during 3 h were treated with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) in the presence or not of VGVAPG (10 $\mu\text{g/ml}$). Four hours after incubation, TNF- α , IL-1 β and IL-6 mRNA expression and secretion were determined by real-time RT-PCR and ELISA, respectively. Data are representative of six independent experiments. *, $p < 0.05$ using a Wilcoxon nonparametric test.

EPs inhibit LPS-induced NF- κ B DNA binding

NF- κ B is one of the main transcription factor involved in pro-inflammatory cytokine production upon LPS stimulation (39, 40). Thus, the effect of VGVAPG on LPS-induced pro-inflammatory cytokine expression in monocytes was addressed at the NF- κ B level. The activation of NF- κ B from nuclear extracts was first investigated through its capacity to bind a consensus DNA sequence. Gel-shift analysis showed that NF- κ B DNA-binding was increased upon LPS monocyte stimulation (Fig. 4A, lane 2 versus lane 1). We first verify DNA-binding specificity by competition experiments (Fig 4A, lanes 4 and 5) and characterization of the NF- κ B complex by super-shift experiments performed with an antibody against the p50 subunit protein (Fig 4B, lane 2 versus lane 1). Then, we clearly demonstrated that VGVAPG decreased the NF- κ B-DNA complex formation generated by monocytes treated with LPS alone (Fig. 4A, lane 3 versus lane 2). To establish the relationship between NF- κ B and pro-inflammatory cytokine regulation, we then performed gel-shift experiments with a NF- κ B specific DNA-binding sequence delineated from the TNF- α promoter. Results obtained with the TNF- α specific NF- κ B probe revealed that the increased in NF- κ B DNA-binding induced by LPS (Fig. 4C, lane 2 versus lane 1) was also reduced when monocytes were co-incubated with VGVAPG (Fig. 4C, lane 3 versus lane 2). To further demonstrate a direct involvement of NF- κ B in TNF- α expression at the genomic level, chromatin immuno-precipitation assay (ChIP) was performed on monocytes stimulated by LPS in the presence or not of VGVAPG. Chromatin was immuno-precipitated with an antibody raised against the NF- κ B p50 subunit, using the TNF- α promoter sequence containing the three NF- κ B sites located at -1058, -822, and -793 respectively. This experiment showed that LPS increased the NF- κ B p50 subunit DNA-binding on the TNF- α promoter. This LPS effect was abolished by VGVAPG co-treatment. These variations were validated by using a non specific IgG as a negative control

and no antibody immuno-precipitation (inputs) to show equal loading in all samples (Fig. 4D).

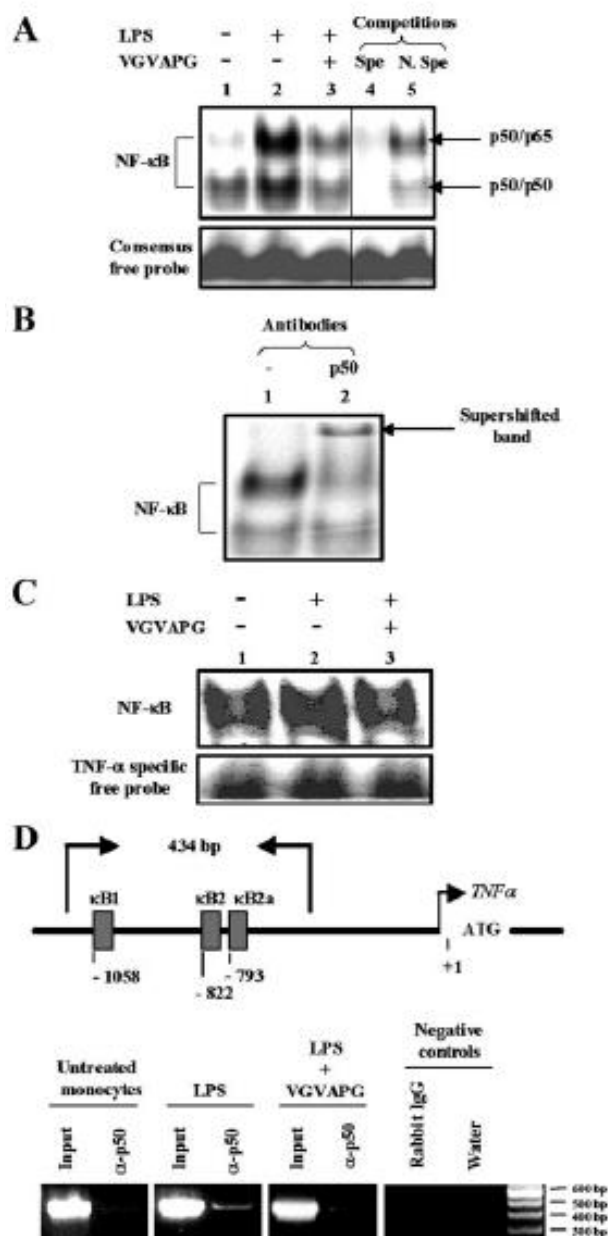


FIGURE 4. EPs inhibit LPS-induced NF- κ B DNA binding. Human monocytes were incubated for 1 h with LPS (1 μ g/ml) in the presence or not of VGAPG (10 μ g/ml). **A**, Nuclear proteins were extracted and NF- κ B DNA binding activity was assessed by electrophoretic mobility shift assay using a consensus DNA sequence. Specificity of DNA binding was assessed by competitions using specific and non-specific unlabelled probes. Data are representative of three independent experiments. **B**, Identification of NF- κ B complex present in the nucleus of human monocytes was studied by super-shift assays where nuclear proteins were incubated or not with antibodies specific for p50 NF- κ B subunit. Data are representative of three independent experiments. **C**, Nuclear proteins were extracted and NF- κ B specific DNA binding activity was assessed by electrophoretic mobility shift assay using a TNF- α specific NF- κ B probe. Data are representative of three independent experiments. **D**, Chromatin was fragmented, immunoprecipitated with an anti-NF- κ B p50 antibody and analysed by PCR. Rabbit anti-IgG antibody was used as negative control and no antibody as positive control (inputs). Data are representative of three independent experiments.

Analysis of NF- κ B upstream pathways involved in EPs down-regulation of LPS monocytes stimulation

We first investigated the canonical NF- κ B signaling pathway. Kinetic analysis of I κ B- α expression by Western Blot showed a decrease of this protein after 30 min following LPS stimulation (Fig. 5A, lane 5). This down-regulation of I κ B- α , characteristic of NF- κ B activation, was not observed in monocytes co-stimulated with LPS and VGVAPG (Fig. 5A, lane 6). We then examined the p38 transduction pathway, also known to interfere on NF- κ B regulation (41), and observed that although LPS highly increased the level of p38 phosphorylation after 30 min (Fig. 5A, lane 5), VGVAPG did not modify LPS effect (Fig. 5A, lane 6). Other kinases such as PKC may interact with NF- κ B pathway and cytokine production (42, 43). We consequently investigated the activation of PKC α , β II and δ following LPS and VGVAPG treatments. The distribution of PKC isoforms among cytosolic and membrane protein fraction showed that LPS-treated monocytes induced cytosol-to-membrane translocation of PKC α and PKC δ isoenzymes (Fig. 5B, lane 2 and 5) but not PKC β II. This transient effect, which was mainly observed after 15 min of incubation, was not significantly changed when cells were co-incubated with VGVAPG (Fig. 5B, lane 3 and 6).

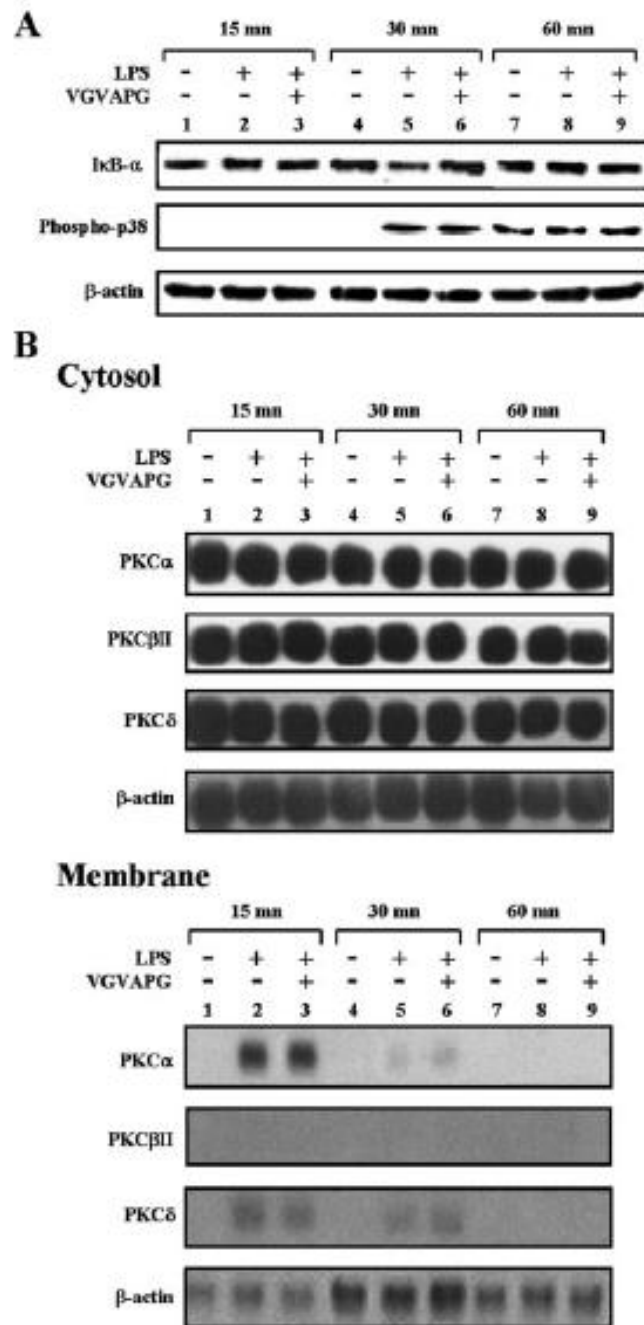


FIGURE 5. EPs target I κ B- α but not p38 and PKC activation in LPS-stimulated monocytes. Human monocytes were incubated for 15, 30 or 60 min with LPS (1 μ g/ml) in the presence or not of VGAPG (10 μ g/ml). **A**, Cytosolic proteins were extracted and I κ B- α and phospho-p38 expression were determined by Western Blot analysis using antibodies raised against I κ B- α and Thr180/Tyr182-phosphorylated p38 MAPKinase, respectively. Data are representative of three independent experiments. **B**, Cytosolic and membrane protein fractions were isolated and tested for the presence of PKC α , β II, and δ isoenzymes by Western blot using specific antibodies raised against human PKC α , β II, and δ isoforms. Data are representative of three independent experiments.

EPs down-regulate NF- κ B and associated pro-inflammatory cytokine expression in activated melanoma cells

To determine whether the EPs effect on the regulation of LPS-mediated pro-inflammatory cytokine expression as shown in human monocytes could be extended to other cell type and system, we used IL-1 β -activated melanoma cells. The pro-inflammatory status of melanoma cells was addressed through expression of GRO- α and IL-8, two pro-inflammatory cytokines whose regulation is linked to NF- κ B pathway. Figure 6A shows that increase of GRO- α and IL-8 mRNA expression induced by IL-1 β (lanes 2 versus lanes 1), was nearly abolished by VGVAPG co-treatment (lanes 3 versus lanes 2). Effects of VGVAPG on cytokine expression were also linked to NF- κ B pathway as shown by gel shift experiments. Indeed, increase of NF- κ B DNA-binding (Fig. 6B, lane 2 versus lane 1) observed in IL-1 β -stimulated melanoma cells was reduced by co-treatment with VGVAPG (Fig. 6B, lane 3 versus lane 2).

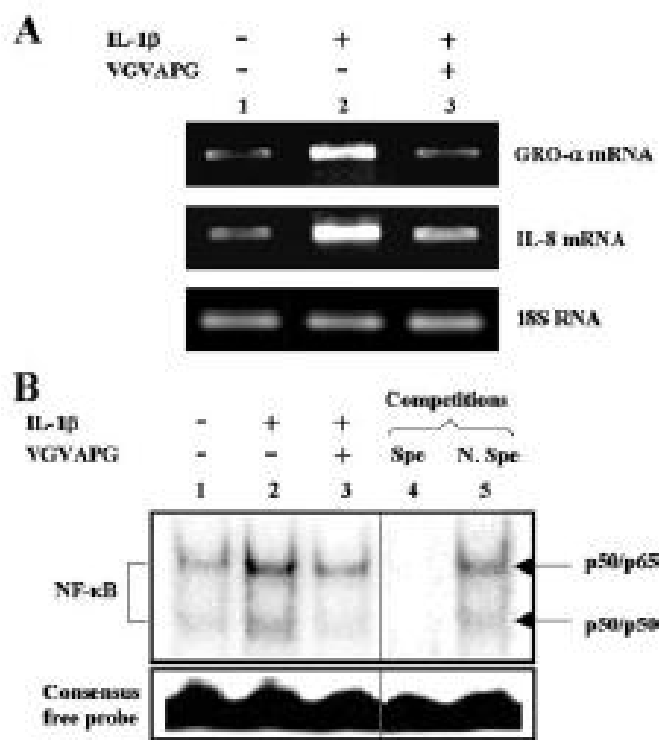


FIGURE 6. EPs down-regulate pro-inflammatory cytokine expression and NF- κ B in activated melanoma cells. Melanoma cells M₃Da were incubated 4 h with IL-1 β (10 ng/ml) in the presence or not of VGVA PG (10 μ g/ml). **A**, Total RNA was extracted and GRO- α and IL-8 mRNA expression was determined by RT-PCR analysis. Data are representative of three independent experiments. **B**, Nuclear proteins were extracted and NF- κ B DNA binding activity was assessed by electrophoretic mobility shift assay using a consensus DNA sequence. Specificity of DNA binding was assessed by competitions using specific and non-specific unlabelled probes (lanes 4 and 5). Data are representative of three independent experiments.

Discussion

In keeping with the potentiality of elastokines to exert biological function in several cell types, we considered, so far, these matrix fragments as potent mediators acting on inflammation. At first, we thus analysed their influence on cytokine expression by human monocytes. Although, VGVAPG elastin peptide alone did not affect TNF- α , IL-1 β and IL-6 production, we evidenced that VGVAPG down-regulated, both at mRNA and protein levels, the synthesis of these pro-inflammatory cytokines in LPS-activated human monocytes. Down-regulation of pro-inflammatory cytokine expression by VGVAPG in LPS-stimulated monocytes was not associated with a regulatory effect on the anti-inflammatory cytokine IL-10. We already showed a direct relationship between EPs and cytokine expression and demonstrated the ability of VGVAPG to polarize a T-helper lymphocyte response by favouring Th-1 cytokine production (IL-2, IFN- γ) (27), and to up-regulate IL-1 β pro-inflammatory cytokine in melanoma cells (33). Taken together, our data suggest that EPs have the potential to interfere with the cascade of events leading to cytokine production and therefore to orientate the inflammatory and/or immune cytokine balance on various cell types.

In LPS-stimulated monocytes, negative regulation of cytokine production could involve several mechanisms. Physiologically, the inflammatory process can be controlled by production of anti-inflammatory mediators such as IL-10 (44) or TGF- β (45). Absence, upon VGVAPG, of IL-10 up-regulation in LPS stimulated human monocytes eliminates the possibility of any participation of a negative feed-back loop limiting the duration and intensity of the inflammatory process by this cytokine. We further speculated that VGVAPG could induce TGF- β , although such factor is generally expressed at later stage of the inflammatory response (46). However, lack of VGVAPG effect on TGF- β expression supported the absence of an anti-inflammatory feed-back loop in our model (not shown). Additional investigations also revealed that EPs inhibitory effect on cytokine expression could not be attributed to a

decrease of LPS interaction with its receptor since neither LPS receptor (CD14 and TLR-4) expression nor LPS binding was altered following EPs treatment. Furthermore, a direct hydrophobic interaction between VGVAPG and LPS could be excluded since scrambled peptide with similar hydrophobicity had no effect. Alike, in monocytes co-stimulated with LPS, EPs still bound to S-gal, which presence had been clearly demonstrated by RT-PCR and confocal microscopy. Furthermore, abrogation by lactose of VGVAPG effect on LPS-enhanced pro-inflammatory cytokines expression underlined the major role of EPs/S-gal interaction on LPS/receptor-enhanced cytokines production. It suggested that EPs could down-regulate LPS-mediated pro-inflammatory cytokines by a trans-regulation mechanism. Such notion of receptor-mediated trans-regulation of adjacent receptors has already been demonstrated in many systems (47-49), and recently extended to S-gal where elastin/receptor interaction was found to increase platelet-derived growth factor (PDGF)/receptor-mediated arterial smooth muscle cells proliferation (32).

NF- κ B is the main transcription factor involved in pro-inflammatory cytokines expression such as IL-1 β , IL-6 and TNF- α (50, 51, 52). We recently demonstrated the prominent role of NF- κ B transcription pathway in the up-regulation of the pro-inflammatory IL-1 β expression following stimulation of melanoma cells by VGVAPG (33). In the present study, despite the lack of effect of VGVAPG on human resting monocytes both on cytokine expression and NF- κ B transcription (not shown), we found that increased pro-inflammatory cytokines expression following LPS stimulation was down-regulated by EPs co-treatment via a decrease of NF- κ B DNA-binding. Implication of the canonical NF- κ B signaling pathway in this regulation was demonstrated both upstream by analysing the dissociation and degradation of I κ B- α , and downstream by showing the interaction of p50 on the TNF- α promoter through chromatin immuno-precipitation experiments. The transcription factor NF- κ B can also be regulated independently of I κ B degradation. For instances, it has been shown that p38 pathway increase

transactivation capacity of NF- κ B (53) leading to gene up-regulation. Furthermore, we previously evidenced p38 activation upon VGVAPG treatment of melanoma cells (33). However, any effect of VGVAPG in LPS-stimulated monocytes on the p38 pathway was detectable. Therefore, the p38 pathway is not linked to the regulatory mechanism induced upon VGVAPG co-stimulation to down-regulate pro-inflammatory cytokines. Since p38 pathway has also been associated to IL-10 regulation, the lack of effect observed on this signaling pathway is in setting with the absence of regulation observed on such anti-inflammatory cytokine expression. Another mechanism for the cell to end NF- κ B activation and gene expression rely on the activation of PKC which shut down transactivation by exporting I κ B- α associated to the heterodimer p50/p65 from the nucleus to cytosol (54). We found that LPS stimulation of human monocytes results in the translocation of PKC α and PKC δ from cytosol-to-nucleus which is in keeping with previous data from the literature (43). Like for the p38 pathway, cytokine down-regulation by VGVAPG was not associated with variation in PKC translocation. Altogether, these data strengthen the pivotal function of NF- κ B in EPs effects on the down-regulation of LPS-induced pro-inflammatory cytokine.

To our knowledge, it is the first time that down-regulation of a signaling pathway as demonstrated here for NF- κ B, is observed upon cell treatment with EPs. Up to now, EPs were only involved in up-regulation of signaling cascade and gene expression (28, 55, 56). Thus, biological effects exerted by EPs should take into account the cell type used (37, 57), the signaling pathway analysed (31, 56) and, as here delineated, the presence or not of co-effectors. As a matter of fact, most of effects of EPs have been previously investigated using resting cells. The nature of the co-effector also seems to be essential since Mochizuki and colleagues found a positive co-stimulatory effect of PDGF and EPs (32) whereas we here showed a negative effect of EPs on LPS-stimulated monocytes. Importantly, the inhibitory effect of EPs on cytokine expression is not specific to the LPS-stimulated monocyte model as

it could be extended to IL-1 β -stimulated melanoma cells in relation to pro-inflammatory cytokine IL-8 and GRO- α expression. Furthermore, in IL-1 β -activated melanoma cells, a model mimicking tumour progression associated with an inflammatory process, EPs inhibitory effect was also observed at the NF- κ B level similarly as in LPS-stimulated monocytes. As a whole, our data further illustrate the critical importance of elastolysis and EPs generation in the control of inflammatory diseases.

Acknowledgments

The authors would like to thank Pr Philippe Nguyen, Catherine Mace and the Etablissement de Transfusion Sanguine Nord-Est (France) for providing heparinized venous blood of healthy donors. The authors are very grateful to Dr Hervé Raoul (Cervi-Lyon, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, France) for many helpful suggestions in the PKC isoenzyme analysis and advices throughout the course of these experiments.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest

References

1. Guha, M. and N. Mackman. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal*. 13:85-94.
2. Dinarello, C. A. 2000. Proinflammatory cytokines. *Chest* 118:503-508.
3. Assoian, R. K., B. E. Fleurdelys, H. C. Stevenson, P. J. Miller, D. K. Madtes, E. W. Raines, R. Ross, and M. B. Sporn. 1987. Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84:6020-6024.
4. Byrne, A. and D. J. Reen. 2002. Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils. *J.Immunol*. 168:1968-1977.
5. Majno, G. and I.Joris. 2004. Cells, Tissues, and Disease: Principles of General Pathology. *Oxford University Press, New York*.
6. Dillon, T. J., R. L. Walsh, R. Scicchitano, B. Eckert, E. G. Cleary, and G. McLennan. 1992. Plasma elastin-derived peptide levels in normal adults, children, and emphysematous subjects. Physiologic and computed tomographic scan correlates. *Am.Rev.Respir.Dis*. 146:1143-1148.
7. Petersen, E., F. Wagberg, and K. A. Angquist. 2002. Serum concentrations of elastin-derived peptides in patients with specific manifestations of atherosclerotic disease. *Eur.J.Vasc.Endovasc.Surg*. 24:440-444.
8. Ntayi, C., A. L. Labrousse, R. Debret, P. Birembaut, G. Bellon, F. Antonicelli, W. Hornebeck, and P. Bernard. 2004. Elastin-derived peptides upregulate matrix metalloproteinase-2-mediated melanoma cell invasion through elastin-binding protein. *J.Invest Dermatol*. 122:256-265.
9. Leppert, D., S. L. Hauser, J. L. Kishiyama, S. An, L. Zeng, and E. J. Goetzl. 1995. Stimulation of matrix metalloproteinase-dependent migration of T cells by eicosanoids. *FASEB J*. 9:1473-1481.
10. Vaday, G. G., R. HersHKoviz, M. A. Rahat, N. Lahat, L. Cahalon, and O. Lider. 2000. Fibronectin-bound TNF-alpha stimulates monocyte matrix metalloproteinase-9 expression and regulates chemotaxis. *J.Leukoc.Biol*. 68:737-747.
11. Deschamps, A. M. and F. G. Spinale. 2006. Pathways of matrix metalloproteinase induction in heart failure: bioactive molecules and transcriptional regulation. *Cardiovasc.Res*. 69:666-676.
12. Pardo, A. and M. Selmán. 1999. Proteinase-antiproteinase imbalance in the pathogenesis of emphysema: the role of metalloproteinases in lung damage. *Histol.Histopathol*. 14:227-233.
13. Fulop, T. and A. Larbi. 2002. Putative role of 67 kDa elastin-laminin receptor in tumor invasion. *Semin.Cancer Biol*. 12:219-229.

14. Galis, Z. S. and J. J. Khatri. 2002. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ.Res.* 90:251-262.
15. Lopez-Boado, Y. S., M. Espinola, S. Bahr, and A. Belaouaj. 2004. Neutrophil serine proteinases cleave bacterial flagellin, abrogating its host response-inducing activity. *J.Immunol.* 172:509-515.
16. Lombard, C., L. Arzel, D. Bouchu, J. Wallach, and J. Saulnier. 2006. Human leukocyte elastase hydrolysis of peptides derived from human elastin exon 24. *Biochimie* 88:1915-1921.
17. Blood, C. H., J. Sasse, P. Brodt, and B. R. Zetter. 1988. Identification of a tumor cell receptor for VGVAPG, an elastin-derived chemotactic peptide. *J.Cell Biol.* 107:1987-1993.
18. Senior, R. M., G. L. Griffin, and R. P. Mecham. 1982. Chemotactic responses of fibroblasts to tropoelastin and elastin-derived peptides. *J.Clin.Invest* 70:614-618.
19. Senior, R. M., G. L. Griffin, R. P. Mecham, D. S. Wrenn, K. U. Prasad, and D. W. Urry. 1984. Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly, a repeating peptide in elastin, is chemotactic for fibroblasts and monocytes. *J.Cell Biol.* 99:870-874.
20. Ghuyssen-Itard, A. F., L. Robert, and M. P. Jacob. 1992. [Effect of elastin peptides on cell proliferation]. *C.R.Acad.Sci.III* 315:473-478.
21. Faury, G., M. T. Ristori, J. Verdeti, M. P. Jacob, and L. Robert. 1995. Effect of elastin peptides on vascular tone. *J.Vasc.Res.* 32:112-119.
22. Hinek, A., M. Rabinovitch, F. Keeley, Y. Okamura-Oho, and J. Callahan. 1993. The 67-kD elastin/laminin-binding protein is related to an enzymatically inactive, alternatively spliced form of beta-galactosidase. *J.Clin.Invest* 91:1198-1205.
23. Hinek, A. 1994. Nature and the multiple functions of the 67-kD elastin-/laminin binding protein. *Cell Adhes.Commun.* 2:185-193.
24. Privitera, S., C. A. Prody, J. W. Callahan, and A. Hinek. 1998. The 67-kDa enzymatically inactive alternatively spliced variant of beta-galactosidase is identical to the elastin/laminin-binding protein. *J.Biol.Chem.* 273:6319-6326.
25. Mecham, R. P., L. Whitehouse, M. Hay, A. Hinek, and M. P. Sheetz. 1991. Ligand affinity of the 67-kD elastin/laminin binding protein is modulated by the protein's lectin domain: visualization of elastin/laminin-receptor complexes with gold-tagged ligands. *J.Cell Biol.* 113:187-194.
26. Larbi, A., G. Levesque, L. Robert, D. Gagne, N. Douziech, and T. Fulop, Jr. 2005. Presence and active synthesis of the 67 kDa elastin-receptor in human circulating white blood cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 332:787-792.
27. Debret, R., F. Antonicelli, A. Theill, W. Hornebeck, P. Bernard, M. Guenounou, and R. Le Naour. 2005. Elastin-derived peptides induce a T-helper type 1 polarization of human blood lymphocytes. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 25:1353-1358.

28. Fulop, T., Jr., M. P. Jacob, Z. Varga, G. Foris, A. Leovey, and L. Robert. 1986. Effect of elastin peptides on human monocytes: Ca²⁺ mobilization, stimulation of respiratory burst and enzyme secretion. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 141:92-98.
29. Kamisato, S., Y. Uemura, N. Takami, and K. Okamoto. 1997. Involvement of intracellular cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase in alpha-elastin-induced macrophage chemotaxis. *J.Biochem.(Tokyo)* 121:862-867.
30. Uemura, Y. and K. Okamoto. 1997. Elastin-derived peptide induces monocyte chemotaxis by increasing intracellular cyclic GMP level and activating cyclic GMP dependent protein kinase. *Biochem.Mol.Biol.Int.* 41:57-64.
31. Duca, L., E. Lambert, R. Debret, B. Rothhut, C. Blanchevove, F. Delacoux, W. Hornebeck, L. Martiny, and L. Debelle. 2005. Elastin peptides activate extracellular signal-regulated kinase 1/2 via a Ras-independent mechanism requiring both p110gamma/Raf-1 and protein kinase A/B-Raf signaling in human skin fibroblasts. *Mol.Pharmacol.* 67:1315-1324.
32. Mochizuki, S., B. Brassart, and A. Hinek. 2002. Signaling pathways transduced through the elastin receptor facilitate proliferation of arterial smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* 277:44854-44863.
33. Debret, R., R. R. Le Naour, J. M. Sallenave, A. Deshorgue, W. G. Hornebeck, M. Guenounou, P. Bernard, and F. D. Antonicelli. 2006. Elastin fragments induce IL-1beta upregulation via NF-kappaB pathway in melanoma cells. *J.Invest Dermatol.* 126:1860-1868.
34. Baumgartner, R. A., V. A. Deramo, and M. A. Beaven. 1996. Constitutive and inducible mechanisms for synthesis and release of cytokines in immune cell lines. *J.Immunol.* 157:4087-4093.
35. Esnault, S., N. Benbernou, F. Lavaud, H. C. Shin, G. Potron, and M. Guenounou. 1996. Differential spontaneous expression of mRNA for IL-4, IL-10, IL-13, IL-2 and interferon-gamma (IFN-gamma) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from atopic patients. *Clin.Exp.Immunol.* 103:111-118.
36. Antonicelli, F., D. Brown, M. Parmentier, E. M. Drost, N. Hirani, I. Rahman, K. Donaldson, and W. MacNee. 2004. Regulation of LPS-mediated inflammation in vivo and in vitro by the thiol antioxidant Nacystelyn. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 286:L1319-L1327.
37. Hance, K. A., M. Tataria, S. J. Ziporin, J. K. Lee, and R. W. Thompson. 2002. Monocyte chemotactic activity in human abdominal aortic aneurysms: role of elastin degradation peptides and the 67-kD cell surface elastin receptor. *J.Vasc.Surg.* 35:254-261.
38. Gangloff, S. C., U. Zahringer, C. Blondin, M. Guenounou, J. Silver, and S. M. Goyert. 2005. Influence of CD14 on ligand interactions between lipopolysaccharide and its receptor complex. *J.Immunol.* 175:3940-3945.
39. Guha, M. and N. Mackman. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.* 13:85-94.

40. Muller, J. M., H. W. Ziegler-Heitbrock, and P. A. Baeuerle. 1993. Nuclear factor kappa B, a mediator of lipopolysaccharide effects. *Immunobiology* 187:233-256.
41. Carter, A. B., K. L. Knudtson, M. M. Monick, and G. W. Hunninghake. 1999. The p38 mitogen-activated protein kinase is required for NF-kappaB-dependent gene expression. The role of TATA-binding protein (TBP). *J.Biol.Chem.* 274:30858-30863.
42. Ghosh, S. and D. Baltimore. 1990. Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B. *Nature* 344:678-682.
43. Kontny, E., M. Kurowska, K. Szczepanska, and W. Maslinski. 2000. Rottlerin, a PKC isozyme-selective inhibitor, affects signaling events and cytokine production in human monocytes. *J.Leukoc.Biol.* 67:249-258.
44. Wang, P., P. Wu, M. I. Siegel, R. W. Egan, and M. M. Billah. 1994. IL-10 inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J.Immunol.* 153:811-816.
45. Letterio, J. J. and A. B. Roberts. 1998. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu.Rev.Immunol.* 16:137-161.
46. Bogdan, C., J. Paik, Y. Vodovotz, and C. Nathan. 1992. Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *J.Biol.Chem.* 267:23301-23308.
47. Boudreau, N. J. and P. L. Jones. 1999. Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. *Biochem.J.* 339 (Pt 3):481-488.
48. Schwartz, M. A. and V. Baron. 1999. Interactions between mitogenic stimuli, or, a thousand and one connections. *Curr.Opin.Cell Biol.* 11:197-202.
49. van Biesen, T., L. M. Luttrell, B. E. Hawes, and R. J. Lefkowitz. 1996. Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocr.Rev.* 17:698-714.
50. Hiscott, J., J. Marois, J. Garoufalidis, M. D'Addario, A. Roulston, I. Kwan, N. Pepin, J. Lacoste, H. Nguyen, G. Bensli, and . 1993. Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. *Mol.Cell Biol.* 13:6231-6240.
51. Dendorfer, U., P. Oettgen, and T. A. Libermann. 1994. Multiple regulatory elements in the interleukin-6 gene mediate induction by prostaglandins, cyclic AMP, and lipopolysaccharide. *Mol.Cell Biol.* 14:4443-4454.
52. Yao, J., N. Mackman, T. S. Edgington, and S. T. Fan. 1997. Lipopolysaccharide induction of the tumor necrosis factor-alpha promoter in human monocytic cells. Regulation by Egr-1, c-Jun, and NF-kappaB transcription factors. *J.Biol.Chem.* 272:17795-17801.
53. Vanden Berghe, W., S. Plaisance, E. Boone, K. De Bosscher, M. L. Schmitz, W. Fiers, and G. Haegeman. 1998. p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J.Biol.Chem.* 273:3285-3290.

54. Han, Y., T. Meng, N. R. Murray, A. P. Fields, and A. R. Brasier. 1999. Interleukin-1-induced nuclear factor-kappaB-IkappaBalpha autoregulatory feedback loop in hepatocytes. A role for protein kinase calpha in post-transcriptional regulation of ikappabalpa resynthesis. *J.Biol.Chem.* 274:939-947.
55. Jacob, M. P., T. Fulop, Jr., G. Foris, and L. Robert. 1987. Effect of elastin peptides on ion fluxes in mononuclear cells, fibroblasts, and smooth muscle cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84:995-999.
56. Varga, Z., M. P. Jacob, L. Robert, and T. Fulop, Jr. 1989. Identification and signal transduction mechanism of elastin peptide receptor in human leukocytes. *FEBS Lett.* 258:5-8.
57. Peterszegi, G., S. Texier, and L. Robert. 1999. Cell death by overload of the elastin-laminin receptor on human activated lymphocytes: protection by lactose and melibiose. *Eur.J.Clin.Invest* 29:166-172.

Footnotes

¹ T.B. is the recipient of a bursary from the French government (Ministère de l'Education Nationale et de la Recherche).

² Present address : Institut de Biologie et de Chimie des Protéines (IBPC), Lyon, France.

³ Address correspondence and reprint requests to Dr. Richard Le Naour, Laboratoire d'Immunologie et de Microbiologie, IPCM, EA3796, IFR53, UFR de Pharmacie, 1 Rue du Maréchal Juin, 51096 Reims Cedex, France. E-mail address: richard.lenaour@univ-reims.fr

⁴ Abbreviations used in this paper : EPs, elastin peptides; EBP, elastin-binding protein; S-gal, spliced galactosidase; PKC, protein kinase C; PDGF, platelet-derived growth factor.

Les principaux résultats obtenus au cours de cette étude sont les suivants :

- Ø Les peptides d'élastine inhibent la production des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 β et IL-6 par les monocytes humains activés par le LPS. Cet effet n'est pas retrouvé vis-à-vis de la cytokine anti-inflammatoire IL-10.
- Ø Les effets des peptides d'élastine sont la conséquence de mécanismes de régulation initiés lors de l'interaction de ces peptides avec leur récepteur spécifique (récepteur S-gal) exprimé à la surface des monocytes.
- Ø Les peptides d'élastine exercent leurs effets régulateurs en inhibant l'activation du facteur de transcription NF- κ B induite par le LPS.
- Ø L'effet inhibiteur des peptides d'élastine est retrouvé dans un autre modèle expérimental, le modèle du mélanome. La production des cytokines pro-inflammatoires GRO- α et IL-8 par les cellules de mélanome sous l'effet activateur de l'IL-1 β est inhibée par les peptides d'élastine par un mécanisme NF- κ B dépendant.

Ce travail a permis de montrer, pour la première fois, un effet inhibiteur des peptides d'élastine sur les fonctions biologiques cellulaires, alors que les données de la littérature laissaient penser jusqu'à présent que les peptides d'élastine exerçaient majoritairement des effets cellulaires activateurs. Par ailleurs, la mise en évidence de propriétés régulatrices des peptides d'élastine par le biais de la régulation de la voie de signalisation NF- κ B/I κ B- α ouvre des perspectives importantes sur les potentialités régulatrices de ces peptides. En effet, ce facteur de transcription régule une grande variété de gènes dont l'activité est essentielle dans de nombreuses situations physiopathologiques et notamment lors de la mise en jeu du système immunitaire. Enfin, ce travail associé aux autres données de la littérature rend compte de la complexité des mécanismes mis en jeu au cours des propriétés régulatrices des peptides d'élastine. Il convient ainsi de prendre en compte dans la compréhension de ces mécanismes de régulation, le type cellulaire sur lequel les peptides d'élastine exercent leurs effets, la voie de signalisation mise en jeu et la présence ou non de molécules co-activatrices dans l'environnement immédiat des peptides d'élastine.

2^{nde} partie : Rôle des peptides d'élastine dans la régulation des fonctions biologiques des cellules dendritiques humaines.

Les cellules dendritiques (CD) sont des cellules clés du système immunitaire par leur fonction de sentinelle dans les tissus périphériques où elles distinguent les antigènes du Soi par rapport aux antigènes du Non Soi. En réponse à la capture d'un antigène, ces cellules initient non seulement une réponse inflammatoire immédiate mais, elles possèdent également la capacité, unique dans le système immunitaire, de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires afin de présenter les antigènes aux lymphocytes et ainsi permettent une réponse spécifique. Lors de cette migration, les CD subissent un processus de maturation essentiel pour leurs fonctions de présentation des antigènes aux Lymphocytes T aboutissant ainsi à la sélection de sous-populations lymphocytaires de différents types (Th-1, Th-2, T régulateurs) en fonction du type de réponse immunitaire mis en jeu.

Les données de la littérature mettent en évidence un rôle régulateur des peptides d'élastine vis-à-vis de populations cellulaires mises en jeu au cours de la réponse inflammatoire et/ou immunitaire. Ainsi, les peptides d'élastine polarisent la réponse lymphocytaire T vers un profil de type Th-1 et contrôlent la production de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes. Sur la base de ces données, nous avons étudié le rôle régulateur des peptides d'élastine sur les cellules dendritiques, cellules fortement impliquées dans la réponse inflammatoire et immunitaire.

Ce travail a fait l'objet d'un document scientifique que nous avons soumis pour publication dans *The Journal of Immunology* avec le titre "Elastin peptides prevent human dendritic cell maturation and induce generation of tolerogenic dendritic cells".

Elastin peptides prevent human dendritic cell maturation and induce generation of tolerogenic dendritic cells¹

Thomas Baranek,^{*} Bouchaib Lamkhioued,^{*} Sophie Gangloff,^{*} William Hornebeck,[†]
Azzaq Belaaouaj,[‡] Moncef Guenounou,^{*} and Richard Le Naour^{2*}

^{*} Laboratoire d'Immunologie et de Microbiologie, IPCM, EA3796, IFR53, UFR de Pharmacie, Reims, France

[‡] Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche Santé 514, IFR53, Centre Hospitalier Universitaire Maison Blanche, Reims, France

[†] Laboratoire de Biochimie, CNRS UMR 6198, IFR53, UFR de Médecine, Reims, France

Running Title: Elastin peptides polarize dendritic cells towards tolerogenic state

Keywords: Dendritic Cells, Antigens/Peptides/Epitopes, Cytokines, Cell Differentiation, Tolerance/Suppression/Anergy

Abstract

In previous works, we previously reported that elastin peptides (EPs) generated by proteolysis of elastic fibers exert regulatory properties on inflammatory and immune cells. Dendritic cells (DC) are central in the immune system to drive immune response or tolerance to antigens. We here investigated whether EPs might modulate the biological properties of DC and first investigated the potential of EPs to influence migration, cytokine production and maturation of monocyte-derived immature DC (imDC). We evidenced that EPs up-regulated the migration of imDC and the production by these cells of the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-12. These effects were found to be mediated by elastin receptor (spliced galactosidase) occupancy, as being suppressed by lactose. EPs alone did not induce imDC maturation, but instead EPs abrogated the transformation of LPS- and TNF- α -activated imDC into mature DC. This EPs-mediated inhibitory effect on DC maturation was associated with an increase of the production of IL-10, IFN- α and TGF- β , three known suppressive cytokines involved in peripheral T cell tolerance. Moreover, we found that EPs could also inhibit the down-regulation of the expression of the tolerance-inducing molecule ILT-3 observed following LPS and TNF- α treatment of imDC. Concomitantly, we demonstrated that EPs supplementation to imDC maturation medium could also induce overexpression of IDO, an enzyme involved in the tolerance state of cells. Altogether, these data demonstrated that presence of EPs during differentiation of monocyte-derived imDC results in a generation of tolerogenic DC that fail to induce T cell proliferation.

Introduction

An essential hallmark of the immune system relies in its ability to recognize and eliminate foreign antigens while not responding to self-antigens. This capacity of unresponsiveness to certain antigens, called tolerance, is driven by various mechanisms including peripheral tolerance (1). Dendritic cells (DC)³, the most potent antigen presentation cells, are main actors leading to either immune stimulation or tolerance depending on the maturation state of the DC (2,3).

Immature DC (imDC), located in peripheral tissues, are specialized in sensing and capturing antigens but are unable to present these antigens efficiently to T cells (4). Upon microbial products activation and/or pro-inflammatory cytokines stimulation, imDC undergo a maturation process leading to the up-regulation of co-stimulatory molecules and chemokine receptor surface expression (4,5). These properties allow imDC to prime naïve antigen specific T cells into lymphoid organs. In steady-state conditions imDC capture apoptotic cells and self-antigens from the environment and can induced T cell anergy or regulatory T cell leading to tolerance (6,7). Induction of this tolerance involves tolerogenic DC characterized by an alternative state of maturation (semi-mature DC) (8) and requires production by these cells of tolerance-inducing molecules such as IL-10 (9,10), IDO (11) and immunoglobulin-like transcript (ILT)-3 (12).

Physio-pathological degradation of extracellular matrix (ECM) by matrix metalloproteinases (MMP) is an important source of self-antigenic peptides, called “matrikines”, which display several biological activities. Some of these ECM-derived peptides, orientate DC functions and maturation to induce immunity or tolerance. As examples, hyaluronic acid promotes differentiation of imDC (13) and osteopontin induces a phenotypic and functional maturation of human DC (14). In contrast, thrombospondin-1, a

potent anti-inflammatory protein, is a negative regulator of DC activation and contributes to the tolerogenic functions of DC (15).

Elastin which provides elasticity to various tissues (16) is reported as a important source of “matrikines” in normal and pathologic connective tissues. Among peptides derived from elastin hydrolysis by elastases, some are particularly implicated in cell regulation. As observed with an hexapeptide i.e. VGVAPG which is repeated several times in the elastin monomer and defines the receptor binding site on the tropoelastin (17). It was shown that VGVAPG through its interaction with the elastin receptor (S-gal) (18-20) exhibited biological activities such as i) chemotactic activity for monocytes, fibroblasts and tumour cells (21,22) and ii) up-regulation of MMP-1 and MMP-2 expressions in fibroblastic cells (23,24).

In recent studies, we showed the ability of VGVAPG to orientate cytokine expression in human lymphocytes towards a Th-1 profile (25) and to inhibit pro-inflammatory cytokine production in LPS-stimulated human monocytes (26). Taken into account our own data which highlighted the role of elastin-derived peptides (EPs) on the regulation of immune and inflammatory cells and the influence of other ECM-derived peptides on the orientation of DC functions, we here hypothesized that EPs, i.e. VGVAPG, could modulate the biological properties of imDC. We evidenced that EPs induced chemo-attraction of human imDC and up-regulate pro-inflammatory cytokine production by these cells through interaction with its receptor. Additionnally, we demonstrated that EPs could counteract the TNF- α - and LPS-induced DC maturation thus contributing to the development of DC exhibiting a tolerogenic pattern.

Materials and methods

Reagents

LPS from *E. coli* 0111:B4, VGVAPG, mitomycin C and lactose were purchased from Sigma-Aldrich. LymphoprepTM medium was obtained from Axis-Shield. The scrambled VVGPGA peptide, not found in tropoelastin sequence, was synthesized by GENEPEP. RPMI 1640 medium, FCS, L-glutamine, penicillin, streptomycin, PBS, ethidium bromide, reverse transcriptase, and all primers and probes were obtained from Invitrogen. Recombinant human GM-CSF (rhGM-CSF), rhIL-4, rhTNF- α , rhIL-2 and rhRANTES were obtained from ImmunoTools. SYBR Green for real-time RT-PCR was purchased from Eurogentec. Mouse FITC-conjugated anti-human CD14 (IgG2a, clone M5E2), mouse FITC-conjugated anti-human CD1a (IgG1, clone H1149), mouse FITC-conjugated anti-human CD4 (IgG1, clone RPA-T4), mouse PE-conjugated anti-human CD3 (IgG2a, clone HIT3a), mouse PE-conjugated anti-human CD83 (IgG1, clone HB15e), mouse PE-conjugated anti-human CD86 (IgG1, clone 2331), mouse FITC-conjugated anti-human ILT-3 (IgG1, clone 2331) and corresponding isotype controls were from BD Pharmingen. Rabbit anti-human IDO polyclonal antibody and AlexaFluor 488-conjugated anti-rabbit IgG was provided by Chemicon and Molecular probes, respectively. Elastin-FITC was obtained from Elastin Products Company.

Human peripheral blood monocyte and lymphocyte isolation

Human peripheral blood monocytes and lymphocytes were obtained under sterile and endotoxin-free conditions by counter-current centrifugal elutriation (service of haematology, Reims Hospital) from heparinized venous blood of healthy consenting donors, after protocol approval by the Ethical Committee of Reims Hospital. Lymphocytes were purified from elutriation of lymphocyte fraction by Ficoll density gradient centrifugation using

LymphoprepTM (density: 1.077 g/ml) in accordance with the Axis-Shield technical data sheets.

Generation of human monocyte-derived dendritic cells

Human immature DC (imDC) were induced by culturing isolated human monocytes (1×10^6 /ml) for 5 days, at 37 °C in 5 % CO₂, under adherence-free conditions in Teflon wells and in RPMI 1640 medium containing L-glutamine (2 mM), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), 10 % heat-inactivated FCS, 800 U/ml rhGM-CSF and 500 U/ml rhIL-4 (DC medium). DC maturation was induced by culturing imDC for an additional 2 days in DC medium in the presence of 1 µg/ml LPS from *E. Coli* and 1000 U/ml rhTNF- α . For experiments, human monocytes or imDC or mature DC (mDC) were shown to be > 98% by FACS analysis and cell viability was over 95% as determined by trypan blue exclusion.

Treatment of human imDC

ImDC cultured under experimental conditions, as above described, were harvested, washed, and seeded onto Teflon wells at 1×10^6 /ml in a serum-starved complete medium and incubated either with LPS (1 µg/ml) or VGVAPG elastin peptide (0.1 and/or 10 µg/ml) or scrambled VVGPGA peptide (10 µg/ml). Following 4 h incubation at 37°C in 5% CO₂, cells were collected for total RNA extraction. Cell culture supernatants were also collected at 4, 8 or 24 h following incubation for quantification of cytokine protein level by ELISA. Cell viability was more than 95% when cells or cell culture supernatants were collected. Elastin binding on imDC pre-treated or not with 10 mM lactose (3 hr) was determined by flow cytometry analysis. Pre-treatment of imDC with lactose was also used to appreciate the specificity of EPs effects. In some experiments, imDC were treated with LPS (1 µg/ml) and rhTNF- α (1000 U/ml) in the presence or not of VGVAPG (10 µg/ml) or VVGPGA (10 µg/ml). Following 48 h incubation at 37°C in 5% CO₂, cells were either collected for surface

immunoglobulin-like transcript-3 (ILT-3) or intracellular IDO staining, or total RNA extraction. Cell culture supernatants were also collected for quantification of cytokine protein level by ELISA. To detect intracytoplasmic cytokines, brefeldin A (5 µg/ml) was added to the culture medium (27). Cell viability was more than 95% when cells or cell culture supernatants were collected.

ImDC chemotaxis assay

Chemotactic activity of imDC was determined using a modified Boyden chamber method as previously described (28). Briefly, 27 µl of RANTES (0.1 µg/ml) or VGVAPG (0.1 to 10 µg/ml) or VVGPGA (0.1 µg/ml) diluted in RPMI 1640 were added to the lower wells of a 48-well Boyden chamber (Neuroprobe) and covered with a polycarbonate filter (8 µm pore size, Nucleopore). Fifty microliters of imDC suspension (1×10^6 cells/ml) were then added to the upper wells of the chamber and incubated 60 min at 37°C in 5 % CO₂. Non migrating cells, in the upper part of the Boyden chamber, were carefully washed and the filter was recovered, fixed and stained with a RAL kit (eosin and bromophenol blue) (Réactifs RAL, France). Migrating cells, in the lower part of the filter, were counted by microscopy in five randomly selected high-power (40 x) fields per well. The experiments were performed in triplicate and results are reported as the mean number of cells per field.

Flow cytometric analysis

Analysis of human monocyte- or DC-associated surface marker expression was determined in non-permeabilized cells (5×10^5) incubated with either FITC-conjugated anti-human CD14, FITC-conjugated anti-CD1a, PE-conjugated anti-CD83, or PE-conjugated anti-CD86 mAb at room temperature for 20 min in the dark to prevent fluorescence quenching. Then, cells were washed twice in PBS. Following two successive centrifugations (500 g, 10 min), cell pellets were resuspended in 500 µl PBS containing 1% PFA, and stored in the dark at 4°C until

analysis. In parallel, isotype-matched controls were used to determine non-specific labeling. A flow cytometric analysis was performed with a FACS AriaTM Instrument using FACSDivaTM software (BD Biosciences). In some experiments, surface staining for ILT-3 was performed, as described above, using FITC-conjugated anti-ILT-3 mAb. For intracellular IDO expression analysis, cell pellets were resuspended successively in FACS lysing and FACS permeabilizing solution for 10 min each and then stained with 5 µg/ml rabbit anti-human IDO Ab at room temperature for 30 min. Cells were then washed twice, and further incubated for 1 h at room temperature in the dark with a secondary anti-rabbit Ab coupled to AlexaFluor 488 fluorochrome. Following two successive centrifugations (500 g, 10 min), pellets were resuspended in 500 µl PBS containing 1% PFA, and stored in the dark at 4°C until FACS analysis. In some experiments, Elastin binding on human imDC was determined following 20 min incubation of cells with 10 µg/ml Elastin-FITC.

Endocytosis assay

The uptake ability of imDC was measured using FITC-conjugated dextran particles diluted in PBS at 10 mg/ml and used at a final concentration of 1 mg/ml in RPMI. ImDC (1×10^6 /ml) were seeded in culture medium, kept at 37°C for 30 min, and then incubated with FITC-dextran at 37°C for 1 hour. Negative control of endocytic capacity was tested at 4°C. Then, cells were washed 3 times in cold PBS and analysed by flow cytometry.

RT-PCR analysis

Total RNA was extracted from 2×10^6 DC using NucleoSpin[®] RNA II (Macherey-Nagel) in accordance with the Macherey-Nagel technical data sheets and analysed on agarose gels stained with ethidium bromide. One µg of Total RNA was reverse-transcribed into cDNA with a reverse transcriptase using SuperScriptTM First-Strand Synthesis System in accordance with the Invitrogen technical data sheets. After reverse transcription, the cDNA product was

amplified by PCR as previously described (29). Primer sequences for S-gal and for the internal controls β -actin were as follows: S-gal sense 5'-CCATCCAGACATTACCTGGCA-3'; S-gal antisense 5'-GATGTTGCTGCCTGCACTGTT-3'; α -actin sense 5'-TGCTATCCAGGCTGTGCTA-3'; β -actin antisense 5'-ATGGAGTTGAAGGTAGTTT-3'. PCR amplifications of cDNA were performed under the following conditions: Initial DNA denaturation for 10 min at 94°C, primer annealing at 58°C (α -actin) or 62°C (S-gal) for 1 min and extension at 72°C for 1 min, for a total of 40 cycles. The ethidium bromide-stained amplified cDNA obtained by RT-PCR were analysed from 1.5% agarose gels under U.V. light (Gel Doc 2000, Biorad). The PCR products for S-gal were analysed comparatively to the amount of the α -actin housekeeping gene detected in the same mRNA sample.

In some experiments, real-time RT-PCR analysis was used. Using this approach, the mRNA levels for TNF- α , IL-12, IL-10, IDO and β -actin were determined with the 7000 sequence detection system ABI Prism sequence detector (Applied Biosystems), using the double-strand-specific SYBR Green (Applied Biosystems) dye system. All reactions were performed according to the following thermal profile: denaturation at 95°C for 15 seconds, annealing and extension at 60°C for 1 min (data collection was performed during the annealing/extension step). Primer sequences for TNF- α , IL-1 β , IL-10, IDO and for the internal control β -actin were determined with Primer Express software (Applied Biosystems) and were as follows: TNF- α forward 5'-GAGACCAGGGAGCCTTTGGT-3'; TNF- α reverse 5'-TTGTGTCAATTTCTAGGTGAGGTCTT-3'; IL-1 β forward 5'-CCACTCCAGACCCAGGAATGT-3'; IL-1 β reverse 5'-TGTCTGGCCTTCTGGAGCAT-3'; IL-10 forward 5'-AGGCGCATGTGAACTCC-3'; IL-10 reverse 5'-CACGGCCTTGCTCTTGTTTT-3'; IDO forward 5'-AGTCCGTGAGTTTGTCTTTCAA-3'; IDO reverse 5'-TTTCACACAGGCGTCATAAGCT-3', β -actin forward 5'-AAATGCTTCTAGGCGGACTATGA-3' and β -actin reverse 5'-TGTTTTCTGCGCAAGTTAGGTTT-3'. Data analysis was performed with the

SDS software (Applied Biosystems). Results are presented as ratios between the target gene mRNA and the β -actin mRNA.

Detection of cytokine concentration

Determination of TNF- α , IL-12p70, IL-10, IFN- α and TGF- β in cell culture supernatants of human DC were performed in duplicate using commercially available high-sensitivity ELISA kit (Quantikine, R&D Systems) according to the manufacturer's instructions. The sensitivity of each ELISA kits was 5.5 pg/ml, 2.5 pg/ml, 3.9 pg/ml, 2.2 pg/ml, 1.7 pg/ml for TNF- α , IL-12p70, IL-10, IFN- α and TGF- β respectively.

CD4⁺ T cells sorting and culture

Lymphocytes (1×10^6 /ml) were cultured at 37 °C in 5 % CO₂ in complete medium and rhIL-2 (40 U/ml) for 6 days. For CD3⁺CD4⁺ T cells sorting, 10^8 cells were used in each experiment. Cells were stained with both PE-conjugated anti-CD3 and FITC-conjugated anti-CD4 antibodies as above described. In parallel, isotype-matched controls were used to determine non-specific labeling. Dead cells were excluded from cytometric analysis by DAPI staining. Cell sorting was performed with a FACS Aria cell sorter (BD Biosciences) equipped with blue, red and violet lasers. The mean purity of the sorted cells was always more than 99%. Isolated CD3⁺CD4⁺ T cells (1×10^6 /ml) were cultured at 37 °C in 5 % CO₂ in complete medium for 1 day. For experiments, cell viability was over 95% as determined by trypan blue exclusion.

CD4⁺ T lymphocyte proliferation assay

CD4⁺ T lymphocyte proliferation assays were performed as previously described (30). Briefly, imDC were 48h-differentiated in mDC as described above in the presence or not of VGVAPG (10 μ g/ml). Then, medium was discarded and cells were treated with 50 μ g/ml mitomycin C for 45 min at 37°C, and washed extensively. Purified autologous CD3⁺CD4⁺ T

lymphocytes (1×10^5 /well) were then added and co-cultured for 6 days. During the last 16 h of incubation, 0.5 μ Ci [3 H]thymidine was added to each well. Incorporation assays were performed in quadruplicate and the amount of radioactivity incorporated into CD3⁺CD4⁺ T lymphocyte DNA was counted on a liquid scintillation counter (Packard, Meriden, CT). Results were expressed as count per minute (cpm) values corrected for spontaneous incorporation of [3 H]thymidine into CD4⁺ T cells.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using a Wilcoxon nonparametric test. p values of less than 0.05 were considered to be statistically significant.

Results

EPs induce chemo-attraction of human imDC via interaction with elastin receptor S-gal

In keeping with the chemotactic activity of EPs on various cell types (21,22,31), we first investigated whether VGVAPG could induce migration of imDC. To that end, human monocyte-derived imDC were generated (see Materials and Methods) and Boyden chamber assays were used to test the effect of VGVAPG (0.1, 1 and 10 $\mu\text{g/ml}$) on in vitro migration of these cells. In agreement with previous reports (32,33), RANTES (0.1 $\mu\text{g/ml}$) used as positive control strongly increased migration of imDC compared to media only (Fig. 1A). VGVAPG at concentration of 0.1 and 1 $\mu\text{g/ml}$ also enhanced the chemotactic migration of imDC ($p < 0.05$), whereas no significant chemotactic response was detected with 10 $\mu\text{g/ml}$ VGVAPG or with the scrambled peptide VVGPG (0.1 $\mu\text{g/ml}$) (Fig. 1A). Analysis of imDC migratory response as a function of VGVAPG concentration revealed a greater rate of cells migration at the lower peptide concentration used.

We then examined whether VGVAPG-elastin receptor (S-gal) interaction could influence the migration of imDC. We first studied the expression of S-gal and showed that imDC expressed S-gal mRNA; this expression was not modified compared to autologous monocytes (Fig. 1B). Presence of S-gal on imDC was confirmed by flow cytometry analysis using FITC labelled-elastin (Fig. 1C). Specificity of elastin binding to its receptor was demonstrated using a pretreatment with 10 mM lactose, a galactosugar known to induce the shedding of S-gal from the cell surface (34). Figure 1C shows that pre-treatment with lactose decreased elastin binding on imDC surface. Statistical significance of this result was further confirmed using four different donors (Fig. 1D). The involvement of S-gal on the regulation of VGVAPG-induced imDC migration was also demonstrated following lactose pre-treatment (Fig. 1E).

FIGURE 1

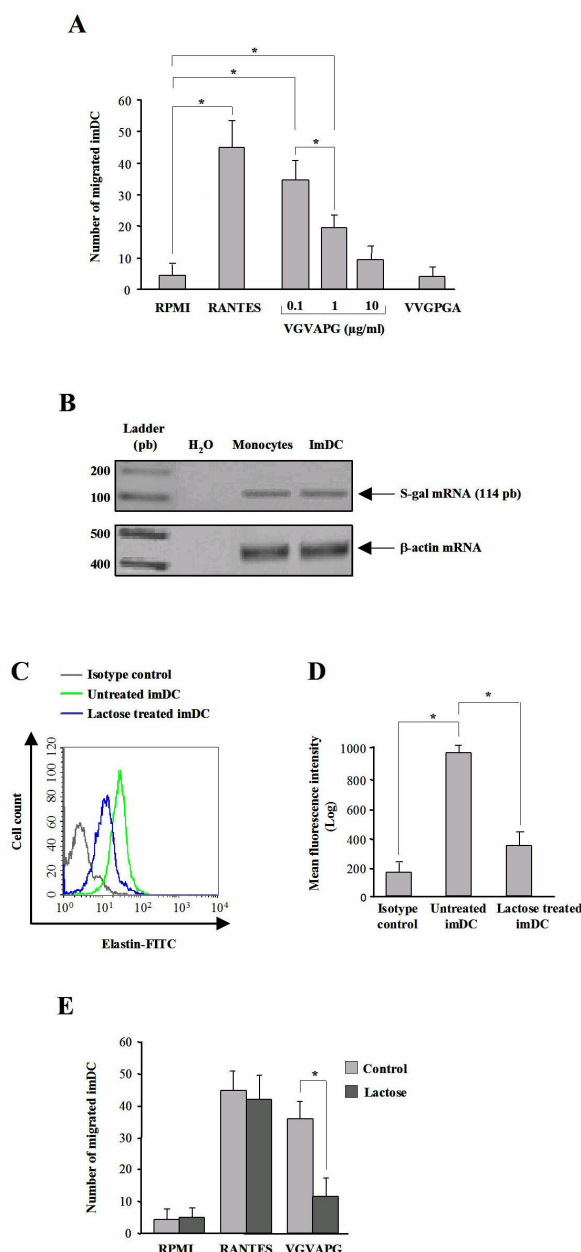


FIGURE 1. EPs induce chemo-attraction of human imDC via interaction with elastine receptor S-gal. **A**, Human imDC were added in the upper wells of a 48-well Boyden chamber in their migration was studied for 1 h in response to increasing concentrations of VGAPG (0.1, 1 and 10 µg/mm) added in the lower wells of the system. RANTES (0.1 µg/ml) and the scrambled VVGPGA peptide (0.1 µg/ml), not found in tropoelastin sequence, were used as positive and negative control, respectively. Data are representative of six independent experiments. *, $p < 0.05$ using a Wilcoxon nonparametric test. **B**, Human monocytes and imDC total RNA were extracted and S-gal and β -actin mRNA expression was determined by RT-PCR analysis. Data are representative of three independent experiments. **C**, Human imDC were pre-incubated or not with lactose (10 mM) for 3 h, and then were treated 20 min with elastin-FITC (10 µg/ml) before analysis by flow cytometry method. Data are representative of six independent experiments. **D**, Statistical analysis of results obtained from the six independent experiments studying elastin-FITC staining on imDC pre-treated or not with lactose was performed using a Wilcoxon nonparametric test. Data are expressed as mean fluorescence intensity. *, $p < 0.05$. **E**, Human imDC were pretreated or not with lactose (10 mM) for 3 h and then cellular migration was analyzed in response to 0.1 µg/ml VGAPG in a Boyden chamber as described above. RANTES (0.1 µg/ml) was use as positive control. Data are representative of six independent experiments. *, $p < 0.05$ using a Wilcoxon nonparametric test.

EPs increase pro-inflammatory cytokine production by imDC but fail to induce cell maturation

To further investigate the EPs-mediated effects on the biological function of imDC, we first analyzed whether treatment with VGVAPG could regulate the production of cytokines by these cells. To that purpose, production of pro-inflammatory (TNF- α , IL-12) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines was determined at the mRNA and protein levels prior and after VGVAPG treatment of imDC. As a positive control, cells were stimulated with 1 μ g/ml *E. coli* LPS. LPS treatment increased mRNA expression of the three cytokines tested (Fig. 2A). Upon stimulation with VGVAPG at a concentration of 10 μ g/ml, TNF- α and IL-12 mRNA expressions were increased when compared with untreated cells whereas IL-10 mRNA expression was not significantly modified (Fig. 2A). In setting with our former results, VGVAPG effects on cytokine expression were receptor-dependent. Lactose pretreatment of imDC abolished the up-regulatory effects of VGVAPG on the TNF- α and IL-12 mRNA expression (Fig. 2A). Effects of 10 μ g/ml VGVAPG on TNF- α and IL-12 production by imDC was also addressed at the protein level. Kinetic analysis of the cytokine release in the cell culture supernatants revealed an optimal up-regulation of TNF- α and IL-12 secretion at 8 h after VGVAPG treatment (Fig. 2B). In agreement with IL-10 mRNA expression levels, IL-10 secretion was not detected in the culture supernatants of VGVAPG-treated imDC (Fig. 2B).

To further analyze the influence of EPs on the functional properties of imDC, we next examined whether VGVAPG could induce maturation of imDC. To that purpose, human monocytes (Fig. 3A) were first cultured for five days in the presence of GM-CSF (800 U/ml) and IL-4 (500 U/ml) to obtain imDC as phenotypically confirmed by flow cytometry analysis of CD14, CD1a, CD86 and CD83 surface expression (Fig. 3B). Then, imDC were cultured for two days in the presence of VGVAPG (10 μ g/ml), while activation of imDC with

TNF- α (100 U/ml) and LPS (1 μ g/ml) was used as a positive control of maturation. As expected, TNF- α and LPS clearly favor phenotypic maturation of imDC and up-regulated CD86 and CD83 expression whereas CD1a decreased (Fig. 3C). In contrast, treatment with VGVAPG did not induce in vitro maturation of imDC (Fig. 2D). In keeping with the reduced endocytosis capacity for of DC during and following their maturation (35) and to confirm the lack of VGVAPG effects on DC maturation, we studied the influence of the incubation of imDC with Dextran-FITC in the presence of VGVAPG. Figure 2E shows that VGVAPG did not alter the high capacity of imDC to internalise dextran moieties.

FIGURE 2

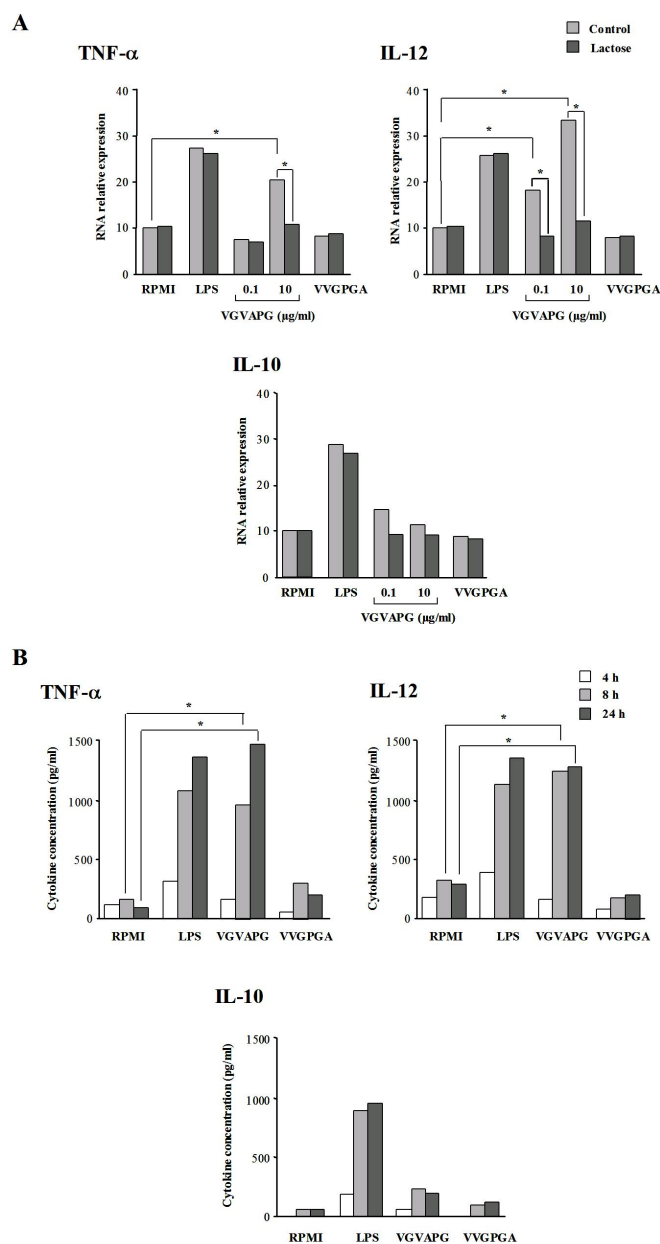


FIGURE 2. EPs increase pro-inflammatory cytokine production by imDC. Human imDC pre-incubated or not during 3 h with lactose (10 mM) were treated with 0.1 and/or 10 μ g/ml VG/VAPG. LPS (1 μ g/ml) and VVGPGA (10 μ g/ml) were used as positive and negative control, respectively. **A**, Four hours after incubation, total RNA was extracted and TNF- α , IL-12 and IL-10 mRNA expression was determined by real-time RT-PCR analysis. Data are representative of six independent experiments. *, $p < 0.05$ using a Wilcoxon nonparametric test. **B**, Four, 8, and 24 h after incubation, TNF- α , IL-12 and IL-10 secretion in the cell culture supernatants was determined by ELISA. Data are representative of six independent experiments. *, $p < 0.05$ using a Wilcoxon nonparametric test.

FIGURE 3

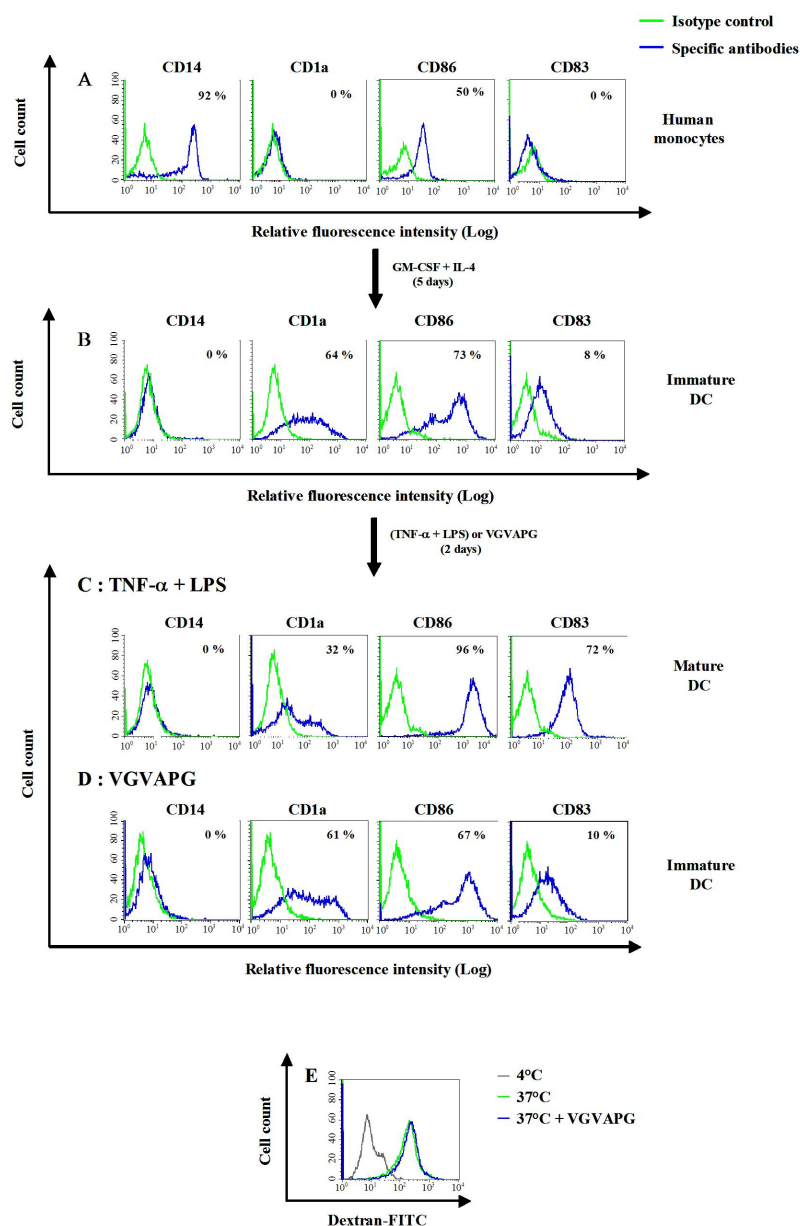


FIGURE 3. EPs fail to induce DC maturation. Human monocytes were isolated by countercurrent centrifugal elutriation and cultured 5 days in the presence of rhGM-CSF (800 U/mL) and rhIL-4 (500 U/mL) to obtain imDC (B). ImDC were then treated during 48 h either with VGVAPG (10 μ g/ml) or with LPS (1 μ g/mL) and TNF- α (1000 U/ml) used as positive control of maturation. A, CD14, CD1a, CD83, and CD86 expression in human monocytes was determined by flow cytometry analysis. B, CD14, CD1a, CD83, and CD86 expression in imDC obtained following treatment of monocytes with rhGM-CSF and rhIL-4 was determined by flow cytometry analysis. C, CD14, CD1a, CD83, and CD86 expression in mature DC obtained following treatment of imDC with LPS and TNF- α (positive control of maturation) was determined by flow cytometry analysis. D, CD14, CD1a, CD83, and CD86 expression in VGVAPG-treated imDC was determined by flow cytometry analysis. In all histograms, blue curves present the relative fluorescence intensity obtained with specific antibodies and green curves present that obtained with isotype-matched controls. Percentage of positive cells was reported in each representation. All data are representative of three independent experiments. E, Human imDC were cultured in the presence or not of VGVAPG (10 μ g/ml). 48 h after treatment, FITC-dextran uptake was determined at both 37°C and 4°C (negative control) by flow cytometry analysis.

EPs inhibit TNF- α - and LPS-induced transformation of imDC into mature DC

It is now widely accepted that pro-inflammatory cytokine production (9,10) and/or microbial infection (36), two potent activator mechanisms of DC maturation, are concomitant with important elastinolytic activity. Thus, the effect of VGVAPG on TNF- α - and LPS-induced DC maturation was addressed. To that purpose, human monocyte-derived imDC were generated (Fig. 4A) and activated for two days with TNF- α (100 U/ml) and LPS (1 μ g/ml) in the presence or not of VGVAPG (10 μ g/ml). Then, CD14, CD1a, CD86 and CD83 expressions were determined by flow cytometry analysis. TNF- α and LPS-induced imDC maturation (Fig. 4 B) was clearly abolished when imDC activated with both TNF- α - and LPS were also co-treated with VGVAPG (Fig. 4C), underlying an inhibitory effect of VGVAPG on DC maturation. On the contrary, co-treatment with scrambled peptide (VVGPGA) does not affect TNF- α - and LPS-induced imDC maturation (Fig. 4D).

FIGURE 4

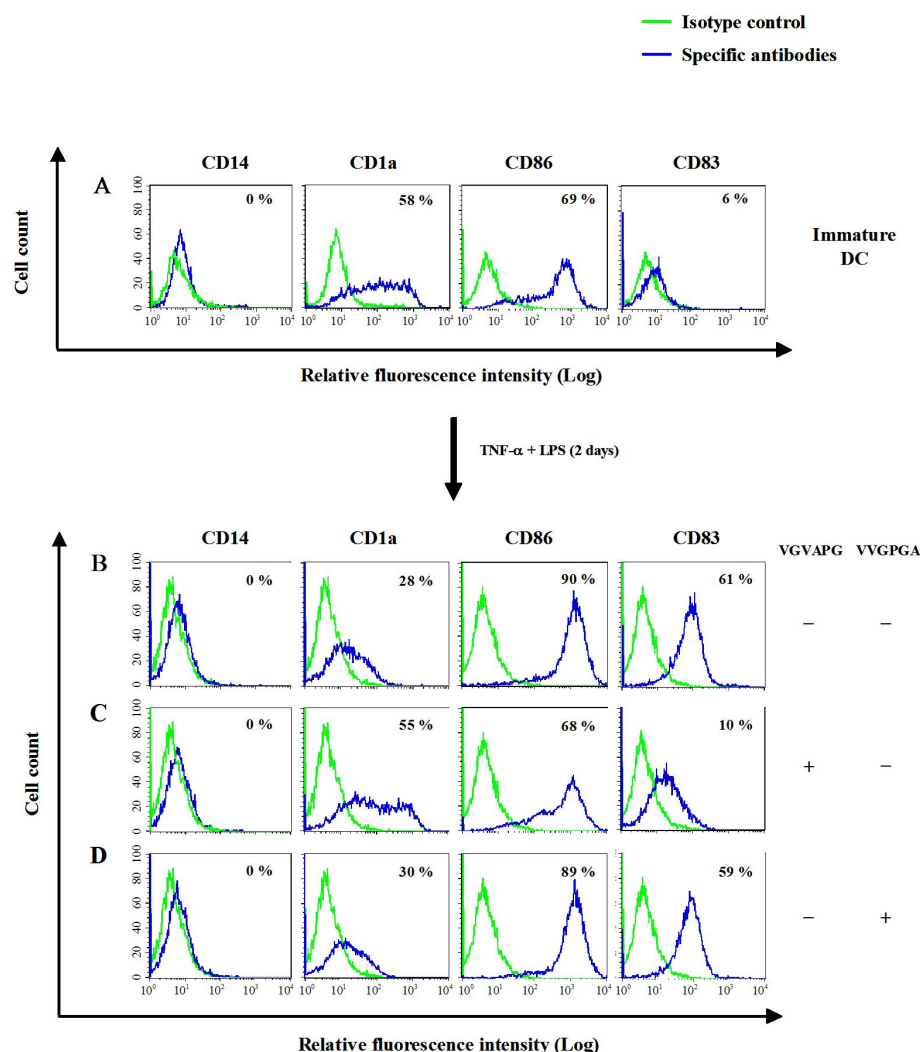


FIGURE 4. EPs inhibit TNF- α - and LPS-induced transformation of imDC into mature DC. Human imDC were treated with LPS (1 μ g/ml) and TNF- α (1000 U/ml) in the presence or not of VGVAPG (10 μ g/ml) or VVGPGA (10 μ g/ml, negative control). A, CD14, CD1a, CD83, and CD86 expression in imDC was determined by flow cytometry analysis. B, CD14, CD1a, CD83, and CD86 expression in mature DC obtained following treatment of imDC with LPS and TNF- α alone (positive control of maturation) was determined by flow cytometry analysis. C, CD14, CD1a, CD83, and CD86 expression following treatment of imDC with LPS and TNF- α in the presence of VGVAPG was determined by flow cytometry analysis. D, CD14, CD1a, CD83, and CD86 expression following treatment of imDC with LPS and TNF- α in the presence of VVGPGA was determined by flow cytometry analysis. In all histograms, blue curves present the relative fluorescence intensity obtained with specific antibodies and green curves present that obtained with isotype-matched controls. Percentage of positive cells was reported in each representation. All data are representative of three independent experiments.

EPs polarize DC towards tolerogenic dendritic cells

The effects of VGVAPG on the TNF- α - and LPS-induced imDC cytokine production were next examined. As observed in Fig. 5A, TNF- α and LPS activation of imDC showed an increase of IL-10 and IL-12 secretion. When TNF- α and LPS-stimulated imDC were co-treated with VGVAPG, production of IL-10 was significantly maximized. On the contrary, VGVAPG antagonized the TNF- α and LPS effects on IL-12 production (Fig. 5A). To define whether the effects observed on imDC treated with VGVAPG on IL-10 production were also observed using other suppressive cytokines, the same culture supernatants were analyzed for IFN- α and TGF- β production. Analysis of the VGVAPG effects revealed a significant up-regulation of IFN- α and TGF- β production as compared to TNF- α - and LPS-stimulated imDC (Fig. 5B). To provide further evidence that co-treatment with VGVAPG might critically influence a tolerant state of imDC, expression of the tolerogenic markers immunoglobulin-like transcript-3 (ILT-3) (12) and IDO (11) was investigated. We first analyzed whether co-treatment with VGVAPG displayed any influence on the expression of ILT-3 at the imDC cell surface. Flow cytometry analysis using ILT-3 specific monoclonal antibody revealed that untreated imDC expressed detectable levels of ILT-3 (Fig. 5C, yellow curves). Upon stimulation with VGVAPG alone, ILT-3 levels were increased (Fig. 5C, left histogram, green curve versus yellow curve) whereas ILT-3 expressions were reduced following TNF- α and LPS stimulation (Fig. 5C, right histogram, blue curve versus yellow curve). Co-treatment of TNF- α - and LPS-stimulated imDC with VGVAPG counteracts the reduction of ILT-3 expression (Fig. 5C, right histogram, green curve versus blue curve). Furthermore, RT-PCR analysis of IDO expression shows that VGVAPG co-treatment of TNF- α - and LPS-activated imDC leads to a significant increase of IDO at the mRNA level (Fig. 5D). Accordingly, flow cytometry experiments revealed that the constitutive expression

of intracellular IDO protein by imDC (Fig. 5E, yellow curve) was highly decreased by TNF- α and LPS activation of these cells ((Fig. 5E, blue curve) while the presence of VGVAPG in the co-incubation medium maximized IDO expression (Fig. 5E, green curve versus yellow curve).

FIGURE 5

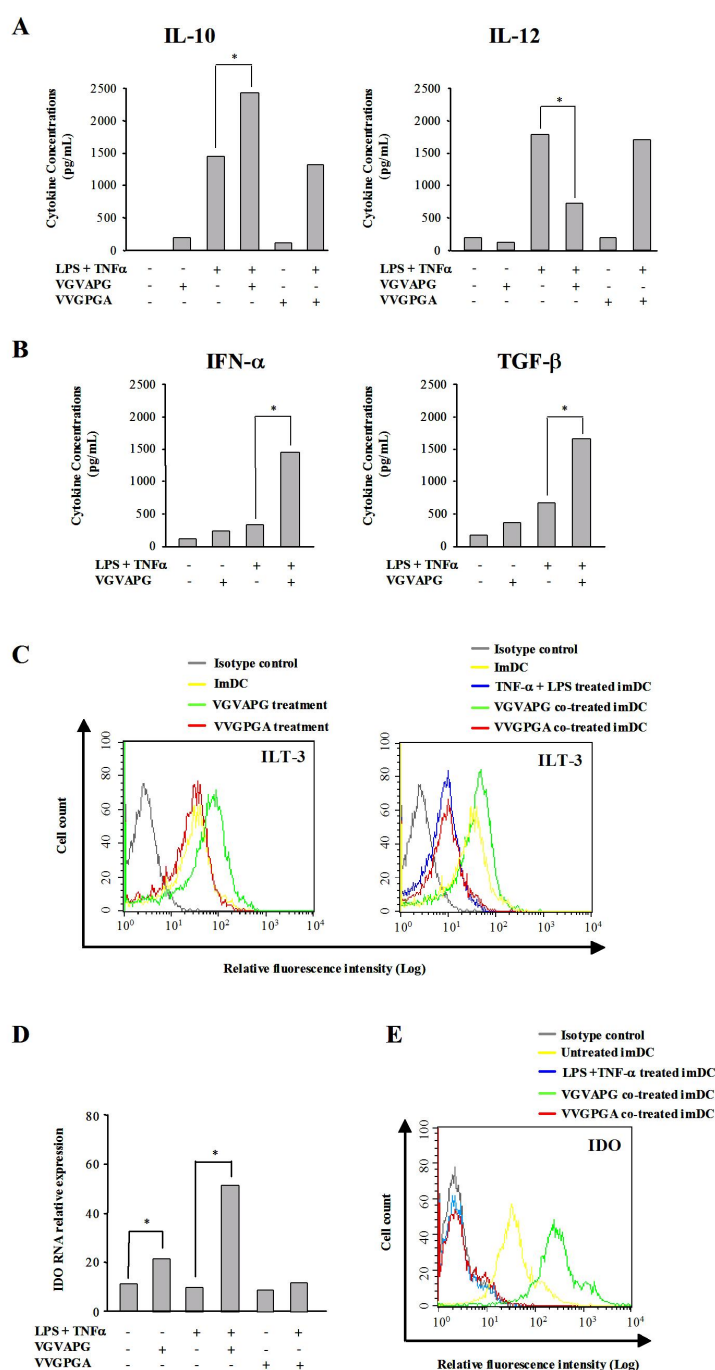


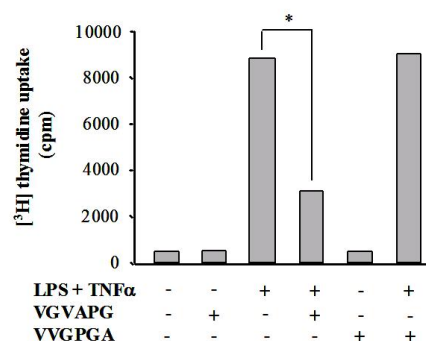
FIGURE 5. EPs polarize DC towards tolerogenic dendritic cells. Human imDC were cultured or not with LPS (1 μ g/ml) and TNF- α (1000 U/ml) in the presence or not of VGAPG (10 μ g/ml) or VVGPGA (10 μ g/ml, negative control). **A** and **B**, Forty eight hours after incubation, IL-10, IL-12, IFN- α and TGF- β secretion in the cell culture supernatants was determined by ELISA. Data are representative of six independent experiments. *, $p < 0.05$ using a Wilcoxon nonparametric test. **C**, Forty eight hours after incubation, ILT-3 expression at the cell surface was determined by flow cytometry analysis. Data are representative of three independent experiments. **D**, Forty eight hours after incubation, total ARN was extracted and IDO mRNA expression was determined by real-time RT-PCR. Data are representative of six independent experiments. *, $p < 0.05$ using a Wilcoxon nonparametric test. **E**, Forty eight hours after incubation, IDO intracellular expression was determined by flow cytometry analysis. Data are representative of three independent experiments.

EPs inhibit CD4⁺T cell proliferation induced by TNF- α - and LPS-treated imDC

The ability of TNF- α and LPS differentiated imDC cultured in the presence or not of VGVAPG to induce CD4⁺ T lymphocyte proliferation was next tested. As illustrated in Fig. 6A, maturation of DC with TNF- α and LPS (not shown) led to a significant increase of autologous CD4⁺ T cell proliferation compared to untreated DC (imDC). When TNF- α - and LPS-activated imDC were co-treated with VGVAPG, proliferation of CD4⁺ T lymphocytes was significantly decreased whereas the scrambled peptide VVGPAAG (0.1 μ g/ml) did not alter T cell proliferation. Specificity of the DC/T lymphocyte interaction in the proliferation of CD4⁺ T lymphocytes was confirmed using various DC/CD4⁺ T lymphocyte ratios (Fig. 6B).

FIGURE 6

A



B

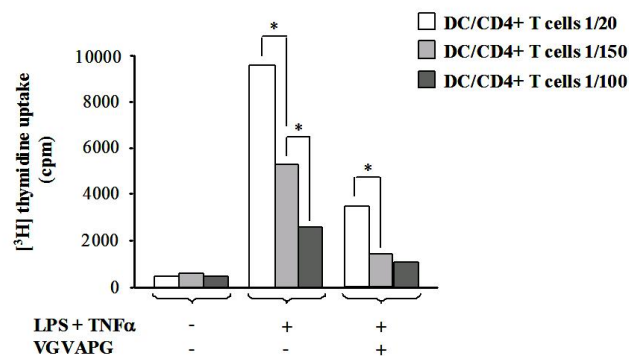


FIGURE 6. EPs inhibit CD4⁺ T cell proliferation induced by TNF- α - and LPS-treated imDC. Human imDC were treated or not with LPS (1 μ g/ml) and TNF- α (1000 U/ml) for 48 h in the presence or not of VGAPG (10 μ g/ml) or VVGPGA (10 μ g/ml, negative control). Then cells were treated with mitomycin C, washed and co-incubated with purified autologous CD4⁺ T lymphocytes. A, Six days following co-culture, incorporation of [³H]thymidine into CD4⁺ T lymphocyte DNA was determined by liquid scintillation counter. Data that are expressed as count per minute (cpm) are representative of three independent experiments. *, p<0.05 using a Wilcoxon nonparametric test. B, Analysis of the specificity of the DC/CD4⁺ T lymphocyte interaction in the level of T lymphocyte-incorporated [³H]thymidine was determined using different ratio of cells. Data are representative of three independent experiments. *, p<0.05 using a Wilcoxon nonparametric test.

Discussion

We initially hypothesized that the presence of EPs in biological fluids or tissues of patients with manifestations of severe inflammatory pathologies might contribute to the regulation of the biological properties of imDC. In this setting, we found that VGVAPG elastin peptide led to the activation of S-gal elastin receptor associated with chemotactic activity on imDC. As previously described by Senior and colleagues on monocytes (22), we evidenced a greater rate of imDC migration at the lower peptide concentration used. The constitutive expression of the S-gal elastin receptor at the surface of imDC was demonstrated both at the mRNA and cell surface expression level. Previous study had demonstrated the presence of the S-gal elastin receptor on human monocyte-derived imDC treated with VGVAPG but not in untreated control imDC (37). Thus, to our knowledge it is the first time that the constitutive presence of elastin receptor at the surface of monocyte-derived DC had been established.

Abrogation of the regulatory effects of VGVAPG on mRNA cytokine expression in the presence of lactose demonstrated the critical role of the EPs/S-gal interaction in the regulation of the synthesis of pro-inflammatory cytokines by imDC. Upon stimulation with VGVAPG, the mRNA levels of the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-12 were significantly increased. Up-regulation of pro-inflammatory cytokine transcript expression by VGVAPG in human imDC was not associated with a regulatory effect on the anti-inflammatory cytokine IL-10. Significant increase of TNF- α and IL-12 without any effect on IL-10 production was also confirmed at the protein levels. It suggested that EPs could actively influence, through the up-regulation of TNF- α and IL-12 synthesis by imDC, both the inflammatory and immune response. Indeed, increase of TNF- α synthesis can activate neutrophils and monocytes/macrophages and up-regulation of IL-12 can favour NK cell activation (38). We already showed that EPs, i.e. VGVAPG, have the potentiality to regulate cytokine expression as demonstrated by their ability to favour a Th-1 lymphocyte response (25), to up-regulate IL-

1 pro-inflammatory cytokine in melanoma cells (39), and to counteract pro-inflammatory cytokine expression in LPS-stimulated human monocytes (40). Overall, our data i) add further insight into the biological effects of EPs reinforcing their involvement in the regulation of both innate and acquired response, and ii) further delineate that the biological effects of EPs on cytokine regulation should take into account the cell type used.

It is now evidenced that matrix components might influence DC functions as demonstrated with hyaluronic acid and osteopontin which promote imDC differentiation (13,14). Then, we further speculated that EPs could also regulate DC maturation. Absence, upon VGVAPG supplementation, of regulation of CD1a, CD83 and CD86, three surface markers known to be critical for DC function, towards a characteristic phenotype of mature DC eliminates the possibility of any participation of EPs on cell maturation process. In keeping with the potentiality of some matrix fragments to act as negative regulator of DC activation (15), we then assumed that EPs might interfere with DC maturation. Indeed, we found that incubation of imDC with LPS and TNF- α in the presence of VGVAPG abrogated transformation of imDC into mature DC. In the same experimental conditions, the cytokine expression pattern was also studied. When TNF- α and LPS-stimulated imDC were co-treated with VGVAPG, production of IL-10 was maximized whereas peptide antagonized the TNF- α and LPS effects on IL-12 production. Furthermore, in the presence of VGVAPG, imDC cultured on maturational condition exhibited high levels of IFN- γ and TGF- β . Like IL-10, these two suppressive cytokines exert a key role in the negative regulation of the immune response, notably as major inducers of peripheral T cell tolerance (41,42,43). This pattern of cytokine production was in keeping with cells that would polarize the immune-inflammatory response towards a Th-2 profile and would induce an immune tolerant state. Interestingly, we here evidenced that EPs exert differential effects on cytokine expression by imDC depending on the presence or not of co-effectors. We found an orientation of the cytokine response towards

a Th-1 profile (IL-12, TNF- α) upon stimulation of imDC with EPs alone, whereas co-stimulatory effects of EPs and LPS/TNF- α induced a Th-2 profile (IL-10, TGF- β).

The inhibitory receptor ILT-3 was shown to be expressed on DC in a tolerogenic state and to inhibit T cell activation by cell to cell contact (12). In the present study, we found that the down-regulation of ILT-3 expression in TNF- α - and LPS-treated imDC was inhibited when VGVAPG was added to the maturation medium. Another mechanism for DC to act as tolerogenic cells relies in its ability to express IDO which metabolizes tryptophan, an important amino-acid whose absence prevents lymphocytes from proliferation (44). Up-regulation of IDO expression was evidenced following VGVAPG co-treatment of TNF- α - and LPS-activated imDC. Additional investigations also revealed that the above described effects of VGVAPG on ILT-3 and IDO expression could be associated with inhibitory effects of peptide on CD4⁺ T cell proliferation following antigen presentation by DC. Recent findings suggest that tolerogenic DC are immature or mature-resistant cells (45) that have impaired ability to synthesize high levels of Th-1-cell-driving cytokines (such as IL-12) (46) but have acquired ability to strongly express tolerance-inducing molecules such as IL-10 (47), IDO (48) and ILT-3 (12). Based on these findings our data would suggest that EPs could induce *in vitro* the processes involved in the generation of DC acquiring many properties of tolerogenic DC.

The mechanisms by which EPs counterbalance TNF- α - and LPS- induced differentiation of imDC. The transcription factor NF- κ B display a major role in DC maturation and Ag presentation and play a key role on determining the phenotype of DC (49,50). Furthermore, DC treated with drugs interfering with the activation of NF- κ B fail to mature in response to LPS and induce tolerogenic DC (51,52). Parallel to this observation, MAPK and AP-1 pathways also appeared to be necessary in the maturation process of DC (53,54). EPs-mediated regulatory effects were observed in various cell types and co-stimulatory conditions

both at the NF- κ B, MAPK and AP-1 levels (39,40,55). Thus, it is tempting to speculate that EPs could counteract these signalling pathways triggered during DC activation and differentiation. Altogether, our data illustrate the critical contribution of EPs in the development of DC having a tolerogenic pattern.

Acknowledgments

The authors would like to thank Pr Philippe Nguyen, Catherine Mace and the Etablissement de Transfusion Sanguine Nord-Est (France) for providing heparinized venous blood of healthy donors.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest

Reference List

1. Steinman, R. M. and M. C. Nussenzweig. 2002. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:351-358.
2. Lutz, M. B. and G. Schuler. 2002. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* 23:445-449.
3. Steinman, R. M. 2003. The control of immunity and tolerance by dendritic cell. *Pathol.Biol.(Paris)* 51:59-60.
4. Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu.Rev.Immunol.* 18:767-811.
5. Sallusto, F., P. Schaerli, P. Loetscher, C. Schaniel, D. Lenig, C. R. Mackay, S. Qin, and A. Lanzavecchia. 1998. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur.J.Immunol.* 28:2760-2769.
6. Jenkins, M. K., C. A. Chen, G. Jung, D. L. Mueller, and R. H. Schwartz. 1990. Inhibition of antigen-specific proliferation of type 1 murine T cell clones after stimulation with immobilized anti-CD3 monoclonal antibody. *J.Immunol.* 144:16-22.
7. Jonuleit, H., E. Schmitt, K. Steinbrink, and A. H. Enk. 2001. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol.* 22:394-400.
8. Reis e Sousa. 2006. Dendritic cells in a mature age. *Nat.Rev.Immunol.* 6:476-483.
9. Geissmann, F., P. Revy, A. Regnault, Y. Lepelletier, M. Dy, N. Brousse, S. Amigorena, O. Hermine, and A. Durandy. 1999. TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J.Immunol.* 162:4567-4575.
10. Wakkach, A., N. Fournier, V. Brun, J. P. Breitmayer, F. Cottrez, and H. Groux. 2003. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity.* 18:605-617.
11. Terness, P., T. M. Bauer, L. Rose, C. Dufter, A. Watzlik, H. Simon, and G. Opelz. 2002. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J.Exp.Med.* 196:447-457.
12. Manavalan, J. S., P. C. Rossi, G. Vlad, F. Piazza, A. Yamilina, R. Cortesini, D. Mancini, and N. Suci-Foca. 2003. High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells. *Transpl.Immunol.* 11:245-258.
13. Yang, R., Z. Yan, F. Chen, G. K. Hansson, and R. Kiessling. 2002. Hyaluronic acid and chondroitin sulphate A rapidly promote differentiation of immature DC with upregulation of costimulatory and antigen-presenting molecules, and enhancement of NF-kappaB and protein kinase activity. *Scand.J.Immunol.* 55:2-13.

14. Renkl, A. C., J. Wussler, T. Ahrens, K. Thoma, S. Kon, T. Uede, S. F. Martin, J. C. Simon, and J. M. Weiss. 2005. Osteopontin functionally activates dendritic cells and induces their differentiation toward a Th1-polarizing phenotype. *Blood* 106:946-955.
15. Doyen, V., M. Rubio, D. Braun, T. Nakajima, J. Abe, H. Saito, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2003. Thrombospondin 1 is an autocrine negative regulator of human dendritic cell activation. *J.Exp.Med.* 198:1277-1283.
16. Kielty, C. M., M. J. Sherratt, and C. A. Shuttleworth. 2002. Elastic fibres. *J.Cell Sci.* 115:2817-2828.
17. Mecham, R. P., A. Hinek, R. Entwistle, D. S. Wrenn, G. L. Griffin, and R. M. Senior. 1989. Elastin binds to a multifunctional 67-kilodalton peripheral membrane protein. *Biochemistry* 28:3716-3722.
18. Hinek, A., M. Rabinovitch, F. Keeley, Y. Okamura-Oho, and J. Callahan. 1993. The 67-kD elastin/laminin-binding protein is related to an enzymatically inactive, alternatively spliced form of beta-galactosidase. *J.Clin.Invest* 91:1198-1205.
19. Hinek, A. 1994. Nature and the multiple functions of the 67-kD elastin-/laminin binding protein. *Cell Adhes.Commun.* 2:185-193.
20. Privitera, S., C. A. Prody, J. W. Callahan, and A. Hinek. 1998. The 67-kDa enzymatically inactive alternatively spliced variant of beta-galactosidase is identical to the elastin/laminin-binding protein. *J.Biol.Chem.* 273:6319-6326.
21. Blood, C. H., J. Sasse, P. Brodt, and B. R. Zetter. 1988. Identification of a tumor cell receptor for VGVAPG, an elastin-derived chemotactic peptide. *J.Cell Biol.* 107:1987-1993.
22. Senior, R. M., G. L. Griffin, R. P. Mecham, D. S. Wrenn, K. U. Prasad, and D. W. Urry. 1984. Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly, a repeating peptide in elastin, is chemotactic for fibroblasts and monocytes. *J.Cell Biol.* 99:870-874.
23. Brassart, B., P. Fuchs, E. Huet, A. J. Alix, J. Wallach, A. M. Tamburro, F. Delacoux, B. Haye, H. Emonard, W. Hornebeck, and L. Debelle. 2001. Conformational dependence of collagenase (matrix metalloproteinase-1) up-regulation by elastin peptides in cultured fibroblasts. *J.Biol.Chem.* 276:5222-5227.
24. Brassart, B., A. Randoux, W. Hornebeck, and H. Emonard. 1998. Regulation of matrix metalloproteinase-2 (gelatinase A, MMP-2), membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) expression by elastin-derived peptides in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. *Clin.Exp.Metastasis* 16:489-500.
25. Debret, R., F. Antonicelli, A. Theill, W. Hornebeck, P. Bernard, M. Guenounou, and R. Le Naour. 2005. Elastin-derived peptides induce a T-helper type 1 polarization of human blood lymphocytes. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 25:1353-1358.
26. Baranek, T., R. Debret, F. Antonicelli, B. Lamkhieud, A. Belaaouaj, W. Hornebeck, P. Bernard, M. Guenounou, and R. Le Naour. 2007. Elastin Receptor (Spliced Galactosidase) Occupancy by Elastin Peptides Counteracts Proinflammatory Cytokine

- Expression in Lipopolysaccharide-Stimulated Human Monocytes through NF- κ B Down-Regulation. *J.Immunol.* 179:6184-6192.
27. Baumgartner, R. A., V. A. Deramo, and M. A. Beaven. 1996. Constitutive and inducible mechanisms for synthesis and release of cytokines in immune cell lines. *J.Immunol.* 157:4087-4093.
 28. Gutzmer, R., K. Langer, S. Mommert, M. Wittmann, A. Kapp, and T. Werfel. 2003. Human dendritic cells express the IL-18R and are chemoattracted to IL-18. *J.Immunol.* 171:6363-6371.
 29. Esnault, S., N. Benbernou, F. Lavaud, H. C. Shin, G. Potron, and M. Guenounou. 1996. Differential spontaneous expression of mRNA for IL-4, IL-10, IL-13, IL-2 and interferon-gamma (IFN-gamma) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from atopic patients. *Clin.Exp.Immunol.* 103:111-118.
 30. Vidal, V., J. Dewulf, and G. M. Bahr. 2001. Enhanced maturation and functional capacity of monocyte-derived immature dendritic cells by the synthetic immunomodulator Murabutide. *Immunology* 103:479-487.
 31. Senior, R. M., G. L. Griffin, and R. P. Mecham. 1982. Chemotactic responses of fibroblasts to tropoelastin and elastin-derived peptides. *J.Clin.Invest* 70:614-618.
 32. Varani, S., G. Frascaroli, M. Homman-Loudiyi, S. Feld, M. P. Landini, and C. Soderberg-Naucler. 2005. Human cytomegalovirus inhibits the migration of immature dendritic cells by down-regulating cell-surface CCR1 and CCR5. *J.Leukoc.Biol.* 77:219-228.
 33. D'Amico, G., G. Bianchi, S. Bernasconi, L. Bersani, L. Piemonti, S. Sozzani, A. Mantovani, and P. Allavena. 1998. Adhesion, transendothelial migration, and reverse transmigration of in vitro cultured dendritic cells. *Blood* 92:207-214.
 34. Mecham, R. P., L. Whitehouse, M. Hay, A. Hinek, and M. P. Sheetz. 1991. Ligand affinity of the 67-kD elastin/laminin binding protein is modulated by the protein's lectin domain: visualization of elastin/laminin-receptor complexes with gold-tagged ligands. *J.Cell Biol.* 113:187-194.
 35. Reis e Sousa, P. D. Stahl, and J. M. Austyn. 1993. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J.Exp.Med.* 178:509-519.
 36. Lopez-Boado, Y. S., M. Espinola, S. Bahr, and A. Belaaouaj. 2004. Neutrophil serine proteinases cleave bacterial flagellin, abrogating its host response-inducing activity. *J.Immunol.* 172:509-515.
 37. Fujimoto, N., A. Akagi, and S. Tajima. 2004. Expression of 67-kDa elastin receptor in annular elastolytic giant cell granuloma: elastin peptides induce monocyte-derived dendritic cells or macrophages to form granuloma in vitro. *Exp.Dermatol.* 13:179-184.
 38. Sabatte, J., J. Maggini, K. Nahmod, M. M. Amaral, D. Martinez, G. Salamone, A. Ceballos, M. Giordano, M. Vermeulen, and J. Geffner. 2007. Interplay of pathogens, cytokines and other stress signals in the regulation of dendritic cell function. *Cytokine Growth Factor Rev.* 18:5-17.

39. Debret, R., R. R. Le Naour, J. M. Sallenave, A. Deshorgue, W. G. Hornebeck, M. Guenounou, P. Bernard, and F. D. Antonicelli. 2006. Elastin fragments induce IL-1 β upregulation via NF- κ B pathway in melanoma cells. *J.Invest Dermatol.* 126:1860-1868.
40. Baranek, T., R. Debret, F. Antonicelli, B. Lamkhieoued, A. Belaaouaj, W. Hornebeck, P. Bernard, M. Guenounou, and R. Le Naour. 2007. Elastin Receptor (Spliced Galactosidase) Occupancy by Elastin Peptides Counteracts Proinflammatory Cytokine Expression in Lipopolysaccharide-Stimulated Human Monocytes through NF- κ B Down-Regulation. *J.Immunol.* 179:6184-6192.
41. Moore, K. W., M. R. de Waal, R. L. Coffman, and A. O'Garra. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu.Rev.Immunol.* 19:683-765.
42. McRae, B. L., B. A. Beilfuss, and G. A. van Seventer. 2000. IFN- β differentially regulates CD40-induced cytokine secretion by human dendritic cells. *J.Immunol.* 164:23-28.
43. Strobl, H. and W. Knapp. 1999. TGF- β 1 regulation of dendritic cells. *Microbes.Infect.* 1:1283-1290.
44. Grohmann, U., F. Fallarino, and P. Puccetti. 2003. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol.* 24:242-248.
45. Reis e Sousa. 2006. Dendritic cells in a mature age. *Nat.Rev.Immunol.* 6:476-483.
46. Koch, F., U. Stanzl, P. Jennewein, K. Janke, C. Heufler, E. Kampgen, N. Romani, and G. Schuler. 1996. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J.Exp.Med.* 184:741-746.
47. Corinti, S., C. Albanesi, A. la Sala, S. Pastore, and G. Girolomoni. 2001. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J.Immunol.* 166:4312-4318.
48. Braun, D., R. S. Longman, and M. L. Albert. 2005. A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation. *Blood* 106:2375-2381.
49. Yoshimura, S., J. Bondeson, B. M. Foxwell, F. M. Brennan, and M. Feldmann. 2001. Effective antigen presentation by dendritic cells is NF- κ B dependent: coordinate regulation of MHC, co-stimulatory molecules and cytokines. *Int.Immunol.* 13:675-683.
50. O'Sullivan, B. J. and R. Thomas. 2002. CD40 ligation conditions dendritic cell antigen-presenting function through sustained activation of NF- κ B. *J.Immunol.* 168:5491-5498.
51. Iruretagoyena, M. I., S. E. Sepulveda, J. P. Lezana, M. Hermoso, M. Bronfman, M. A. Gutierrez, S. H. Jacobelli, and A. M. Kalergis. 2006. Inhibition of nuclear factor- κ B enhances the capacity of immature dendritic cells to induce antigen-specific tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 318:59-67.
52. Blumel, S., S. Kirchberger, V. N. Bochkov, G. Kronke, K. Stuhlmeier, O. Majdic, G. J. Zlabinger, W. Knapp, B. R. Binder, J. Stockl, and N. Leitingner. 2005. Oxidized

- phospholipids negatively regulate dendritic cell maturation induced by TLRs and CD40. *J.Immunol.* 175:501-508.
53. Nakahara, T., Y. Moroi, H. Uchi, and M. Furue. 2006. Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement. *J.Dermatol.Sci.* 42:1-11.
 54. Santambrogio, L., I. Potolicchio, S. P. Fessler, S. H. Wong, G. Raposo, and J. L. Strominger. 2005. Involvement of caspase-cleaved and intact adaptor protein 1 complex in endosomal remodeling in maturing dendritic cells. *Nat.Immunol.* 6:1020-1028.
 55. Duca, L., E. Lambert, R. Debret, B. Rothhut, C. Blanchevove, F. Delacoux, W. Hornebeck, L. Martiny, and L. Debelle. 2005. Elastin peptides activate extracellular signal-regulated kinase 1/2 via a Ras-independent mechanism requiring both p110gamma/Raf-1 and protein kinase A/B-Raf signaling in human skin fibroblasts. *Mol.Pharmacol.* 67:1315-1324.

Footnotes

¹ T.B. is the recipient of a bursary from the French government (Ministère de l'Education Nationale et de la Recherche).

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Richard Le Naour, Laboratoire d'Immunologie et de Microbiologie, IPCM, EA3796, IFR53, UFR de Pharmacie, 1 Rue du Maréchal Juin, 51096 Reims Cedex, France. E-mail address: richard.lenaour@univ-reims.fr

³ Abbreviations used in this paper: EPs, elastin peptides; DC, dendritic cells; S-gal, spliced galactosidase; ILT-3, immunoglobulin-like transcript-3; IDO, indoleamine 2,3-dioxygenase.

Les principaux résultats obtenus au cours de ce travail sont les suivants :

- Ø Les peptides d'élastine ont un effet chimio-attractant vis-à-vis des CD immatures et ils stimulent la production d'IL-12 et de TNF- α par ces cellules.
- Ø Les effets des peptides d'élastine sur les CD immatures sont la conséquence d'une interaction avec leur récepteur spécifique exprimé à la surface de ces cellules.
- Ø Les peptides d'élastine n'ont pas la capacité à induire la maturation des CD mais ils inhibent la maturation des CD immatures induite par le LPS et le TNF- α .
- Ø Cet effet inhibiteur des peptides d'élastine s'accompagne d'une polarisation des CD activées par le LPS et le TNF- α vers un phénotype tolérogénique ce qui conduit à l'inhibition de la prolifération des LT CD4⁺.

Ce travail nous a permis de mettre en évidence, pour la première fois, la capacité des peptides d'élastine à réguler les fonctions effectrices des cellules dendritiques. L'induction de CD tolérogéniques sous l'effet des peptides d'élastine est à prendre en compte dans la régulation de la réponse immunitaire. Cependant, il convient de garder à l'esprit que si ces effets peuvent se révéler bénéfiques dans certaines pathologies inflammatoires, ils pourraient au contraire s'avérer délétères au cours d'un processus tumoral où ces peptides seraient produits en grande quantité, comme cela est le cas dans le mélanome. Enfin, ce travail montre, une fois de plus, que les peptides d'élastine sont des éléments régulateurs importants des propriétés effectrices de cellules activement impliquées dans l'inflammation et l'immunité (lymphocytes, monocytes, cellules dendritiques).

Discussion générale

La dégradation des molécules de la matrice extracellulaire (MEC) conduit à la production de peptides, appelés "matrikines". Ces peptides ont la capacité d'influencer le comportement des cellules présentes dans leur environnement. Depuis plusieurs années, l'élastine est décrite comme une cible importante au cours des pathologies inflammatoires touchant les tissus élastiques. Au cours de ces pathologies, l'élastine est le siège d'une dégradation intense qui génère la production de peptides solubles d'élastine doués de nombreuses activités biologiques qu'ils exercent par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique mis en évidence à la surface de nombreuses cellules.

L'objectif de ce travail a été de caractériser l'implication des peptides issus de la dégradation de l'élastine sur la régulation de la réponse inflammatoire et immune en étudiant les effets de ces peptides sur les propriétés fonctionnelles des monocytes et des cellules dendritiques humaines.

1. Le contexte inflammatoire et les différents acteurs

L'élastine est une protéine de la MEC possédant une durée de vie très longue, pratiquement égale à l'espérance de vie humaine au niveau de certains organes (Shapiro *et al.*, 1991). Elle est donc très peu dégradée et très peu renouvelée dans des conditions physiologiques. L'apparition de produits de dégradation de l'élastine est donc un signal important du développement de processus pathologiques siégeant au niveau de tissus riches en élastine. Une des caractéristiques de la réponse inflammatoire est la production d'enzymes telles que les sérines protéases et les métalloprotéases matricielles (MMP) qui participent au remodelage tissulaire. Certaines de ces enzymes sont douées d'activité élastinolytique qui conduisent à la dégradation de l'élastine et à la genèse de peptides solubles d'élastine (PDE) (Galis and Khatri., 2002 ; Pardo et al., 1999).

Dans les pathologies à forte composante inflammatoire et touchant des tissus riches en élastine telles que l'athérosclérose ou l'anévrisme aortique abdominal (AAA), la Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) ou le mélanome, les peptides d'élastine sont retrouvés à de fortes concentrations dans les liquides biologiques ou les tissus (Dillon *et al.*, 1992 ; Jacob *et al.*, 1992 ; Lindholt *et al.*, 1997 ; Ntayi *et al.*, 2004). Ces peptides se

retrouvent ainsi au contact de populations cellulaires résidentes ou recrutées au niveau du site inflammatoire et impliquées dans l'installation et la régulation de la réponse inflammatoire et immune. Dans les pathologies artérielles, l'infiltrat inflammatoire est caractérisé par la présence de lymphocytes T et par une forte composante macrophagique (Schafer et al., 2003 ; Stemme et al., 1991). Ces pathologies sont donc associées à des taux élevés de peptides d'élastine sériques et à la co-existence au niveau systémique de ces peptides avec les monocytes et les lymphocytes circulants recrutés ultérieurement au niveau du site inflammatoire. Au cours de la BPCO, l'infiltrat cellulaire majoritairement présent dans les LBA est constitué par des PNN et des lymphocytes T CD8⁺ (Eidelman et al., 1990 ; Fournier et al., 1989). Les agents étiologiques de la BPCO sont les agents infectieux et la fumée de cigarette (Barnes., 2000). Les lipopolysaccharides (LPS) qui sont présents sur la paroi des bactéries à Gram négatif et qui se concentrent dans la fumée de cigarette sont des molécules importantes dans le déclenchement de cette pathologie. Au cours du mélanome, les peptides d'élastine tissulaires produits au cours de la réponse inflammatoire qui se surajoute au contexte tumoral sont au contact permanent avec les lymphocytes T et les CD mises en jeu dans la réponse immunitaire induite par le processus tumoral (Woods *et al.*, 2005).

Sur la base de ces données expérimentales, nous avons étudié dans ce travail de thèse le rôle des peptides d'élastine sur la régulation de deux populations cellulaires, acteurs clés de la réponse immunitaire et/ou inflammatoire : les monocytes humains et des cellules dendritiques humaines.

2. Activités biologiques des PDE sur les monocytes humains

Au cours des pathologies inflammatoires les monocytes se retrouvent dans un milieu complexe constitué de nombreux facteurs solubles pouvant provenir à la fois d'un environnement exogène (agents microbiens) et d'un environnement endogène (peptide issus de la dégradation de la MEC).

Dans un tel contexte, nous avons montré que les PDE exercent des activités inhibitrices sur les effets induits par le LPS au niveau des monocytes humains. Ainsi, les PDE diminuent le niveau de production du TNF- α , de l'IL-1 β et de l'IL-6 induit par une activation des monocytes humains par le LPS. Cette diminution de la production de TNF- α , d'IL-1 β et d'IL-6 a été observée au niveau génique, au niveau de l'expression intracellulaire de la protéine, et, au niveau de la sécrétion de la protéine dans les surnageants de culture. L'existence d'un

récepteur spécifique des peptides d'élastine a été mis en évidence à la surface de nombreuses cellules (Duca *et al.*, 2004) et plus particulièrement à la surface des monocytes (Larbi *et al.*, 2005). Lors de ce travail, nous avons confirmé que le gène codant pour le récepteur de l'élastine est exprimé dans les monocytes humains et que cette expression est associée à la présence du récepteur à la surface des monocytes. Nous avons également montré que les effets des PDE, sur la régulation de la synthèse des cytokines pro-inflammatoires induite par activation des monocytes par le LPS, sont consécutifs à l'interaction entre les PDE et le récepteur à l'élastine. Pour leur part, les effets du LPS sur la production des cytokines par les monocytes sont la conséquence de l'interaction du LPS avec le complexe récepteur (CD14/TLR4) présents à la surface des monocytes (Guha and Mackman., 2001 ; Visintin *et al.*, 2001).

Nous avons confirmé l'effet inhibiteur des PDE décrit ci-dessus dans un modèle de mélanome où un état d'inflammation est associé à un processus tumoral. Dans ce modèle, nous avons mis en évidence le potentiel inhibiteur des PDE sur la synthèse de deux cytokines pro-inflammatoires, l'IL-8 et GRO- α , induite par l'IL-1 α dans les cellules de mélanome.

Il est important de noter que dans les deux modèles expérimentaux étudiés les effets inhibiteurs des peptides d'élastine ont été décrits dans un système de co-stimulation. PDE et LPS dans le modèle du monocyte et PDE et IL-1 β dans le modèle du mélanome. Cependant, de tels effets des PDE ne peuvent être généralisés puisque ces peptides ont un effet activateur de la production d'IL-2 et d'IFN- γ dans un autre modèle de co-stimulation où les PDE interfèrent avec les effets de la phyto-hémagglutinine A (PHA) sur les lymphocytes T humains (Debret *et al.*, 2005). Ceci nous amène à conclure que le modèle cellulaire étudié mais aussi la nature de la co-stimulation et les récepteurs mis en jeu doivent être pris en compte dans la compréhension des effets liés aux PDE. Un élément de réponse aux effets identiques des PDE lorsqu'ils s'opposent aux effets du LPS ou de l'IL-1 β peut être apporté par le fait que les récepteurs au LPS et le récepteur de l'IL-1 β (IL-1R) sont classés dans une même famille de récepteurs ayant en commun un domaine cytoplasmique "Toll/IL-1 receptor" (TIR) (Martin and Wesche., 2002). La séquence en acides aminés du domaine cytoplasmique de l'IL-1R partage 45% d'homologie avec le domaine cytoplasmique du TLR-4 (Gay and Keith., 1991). Cette homologie d'organisation suggère que le récepteur de l'IL-1 et le TLR-4 dérivent d'un même gène ancestral et déclenchent des signaux intracellulaire similaires via leur domaine TIR (Heguy *et al.*, 1992 ; Martin and Wesche., 2002).

2.1. PDE et récepteur au LPS

Certains peptides de la matrice extracellulaire peuvent se fixer sur le TLR-4 et induire son activation (Chang *et al.*, 2007 ; Schaefer *et al.*, 2005). Ce n'est cependant pas le cas des PDE dont l'action inhibitrice sur les effets du LPS ne se situe pas au niveau des récepteurs membranaires. En effet, *i)* la stimulation des monocytes par les PDE ne modifie pas la fixation du LPS à leur surface, *ii)* l'expression du CD14 et du TLR-4 n'est pas diminuée lors d'un co-traitement des monocytes par les peptides d'élastine et le LPS, et, enfin, *iii)* nous avons récemment montré que la fixation des PDE à la surface des monocytes n'est pas modifiée par l'utilisation d'un anticorps dirigé contre le TLR-4 (résultats non présentés dans ce travail). De plus, le blocage des effets des PDE par un pré-traitement des cellules au lactose indique que les effets des PDE s'exercent via leur interaction avec le récepteur à l'élastine.

Toutefois nous ne pouvons pas exclure qu'il puisse exister des interactions entre le TLR-4 et le récepteur à l'élastine au niveau membranaire. En effet, la fixation des PDE sur le récepteur à l'élastine pourrait entraîner une délocalisation membranaire de ce récepteur conduisant à un rapprochement avec le TLR-4 et à l'inhibition de ce dernier. La fixation du LPS par le complexe récepteur CD14/TLR-4 conduit à la localisation de ce complexe dans des domaines de la membrane plasmique très riches en glycolipides appelés radeaux lipidiques (Triantafilou *et al.*, 2002). Récemment, une équipe de l'université de Reims a décrit un regroupement des récepteurs de l'élastine au niveau des radeaux lipidiques sur la membrane des fibroblastes humains en présence de PDE. Cette relocalisation est nécessaire à la transmission du signal consécutif à l'interaction PDE/récepteur de l'élastine et ceci via la sous-unité NEU-1 du récepteur (Duca *et al.*, 2007). Par ailleurs, d'autres études ont démontré que le ganglioside GM3, exprimé à la surface des monocytes (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1992) est un substrat de la NEU-1. L'interaction GM3/NEU-1 conduit à la production de lactosylcéramides (Chen *et al.*, 2000). Or les lactosylcéramides inhibent l'expression des ARNm codant pour les cytokines pro-inflammatoires induite par le LPS (Pannu *et al.*, 2004). Cet effet inhibiteur s'exerce en bloquant l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Pannu *et al.*, 2004). La co-stimulation du récepteur à l'élastine et du complexe CD14/TLR-4 pourrait donc conduire à la co-localisation de ces deux récepteurs au niveau des radeaux lipidiques et à une régulation, par le récepteur de l'élastine, des signaux intracellulaires transmis par le TLR-4.

2.2. PDE et régulation de NF- κ B

Le facteur de transcription NF- κ B joue un rôle central dans la régulation de la réponse inflammatoire et immunitaire (Hayden *et al.*, 2006). Il est fortement impliqué dans la synthèse des cytokines inflammatoires (Guha and Mackman., 2001 ; Muller *et al.*, 1993), des MMP élastinolytiques (Shapiro., 1997 ; Vaday and Lider., 2000 ; Vlahos *et al.*, 2006) ainsi que dans la régulation de nombreux gènes essentiels à la maturation des cellules dendritiques (Koski *et al.*, 2001 ; Li and Verma., 2002).

L'activation du TLR-4, consécutive à la fixation du LPS, a notamment pour conséquence le déclenchement de voies de signalisation aboutissant à la translocation nucléaire de NF- κ B qui se fixe sur les promoteurs de gènes afin d'activer leur transcription (Kawai and Akira., 2006). Nous avons montré dans ce travail que les PDE inhibent la translocation nucléaire de NF- κ B induite par le LPS dans les monocytes humains. Les PDE inhibent de façon spécifique la fixation de NF- κ B sur le gène du TNF- α ce qui contribue à la diminution d'expression des ARNm de la cytokine. Nous avons confirmé que NF- κ B est impliqué dans la synthèse de l'IL-8 et de GRO- α dans les cellules de mélanomes activées par l'IL-1 β et que la translocation nucléaire de NF- κ B, induite par l'IL-1 β , est bloquée par les PDE. Ce facteur de transcription est également impliqué dans la régulation de la synthèse de l'IL-1 β (Hiscott *et al.*, 1993) et de l'IL-6 (Dendorfer *et al.*, 1994) dont la synthèse est inhibée par les PDE. Nous pouvons donc supposer que les effets inhibiteurs des PDE sur la production de l'IL-1 β et de l'IL-6 par les monocytes activés par le LPS, sont également consécutifs à une inhibition de la fixation de NF- κ B sur les promoteurs des gènes codant pour ces deux cytokines.

Les PDE inhibent l'activation de NF- κ B en protégeant I κ B- α de la dégradation induite par le LPS. Différentes voies de signalisation intracellulaires peuvent conduire à la dégradation de I κ B- α en réponse au LPS (O'Mahony *et al.*, 2000) mais dans notre système expérimental, ni la phosphorylation de la p38 ni l'activation des PKC α et des PKC δ ne sont impliquées dans l'inhibition de l'activation de NF- κ B. La voie de signalisation NF- κ B/I κ B- α est donc primordiale dans l'activité inhibitrice des PDE vis à vis des effets du LPS.

La complexité des voies de signalisation et de leurs interactions aboutissant à la régulation des gènes est telle que nous ne pouvons pas exclure l'implication d'autres signaux intracellulaires dans les effets des PDE. Par exemple, la voie Erk1/2 activant le facteur de transcription AP-1 est commune aux récepteurs de l'élastine et du LPS (Duca *et al.*, 2002 ;

Kawai and Akira., 2006). Cette voie de signalisation est impliquée dans de nombreux effets des PDE (Duca *et al.*, 2005) au niveau des fibroblastes.

3. Activités biologiques des PDE sur les cellules dendritiques humaines

Les cellules dendritiques immatures ont un double rôle au cours de la réponse immunitaire ; elles exercent des capacités immunomodulatrices dans le cadre de la réponse innée mise en place au site inflammatoire et des fonctions de présentation des antigènes aux cellules T lors de l'initiation de la réponse immunitaire adaptative.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons montré que les PDE exercent, *in vitro*, un effet chimio-attractant vis-à-vis des cellules dendritiques immatures (CDim) et que cet effet est associé à une augmentation de la production de TNF- α et d'IL-12 par ces cellules. Ces deux cytokines sont impliquées dans la polarisation de la réponse immune vers un profil de type Th-1 car elles induisent la production d'IFN- γ par les LT et les NK (Trinchieri., 2003). Ces résultats sont à prendre en compte dans le cadre d'une réponse inflammatoire aiguë où les CD immatures représentent une population cellulaire résidente au niveau tissulaire et sont donc rapidement mobilisables pour initier une réponse immunitaire (Hume., 2006).

Les effets des PDE sur les CDim s'exercent via une interaction avec le récepteur à l'élastine dont nous avons démontré la présence de façon constitutive à la surface de ces cellules alors que l'expression de ce récepteur n'avait été démontrée jusqu'à présent qu'après induction par les PDE eux-mêmes (Fujimoto *et al.*, 2004). Ce récepteur, également présent à la surface des monocytes humains (Larbi *et al.*, 2005), est essentiel aux effets chimio-attractants des PDE qu'ils soient exercés sur les monocytes (Senior *et al.*, 1984) ou sur les CD humaines.

L'étude de l'effet des PDE sur le niveau d'expression des molécules CD1a, CD83 et CD86 exprimées à la surface des CDim, nous a permis de conclure que les PDE ne modifiaient pas les caractéristiques phénotypiques des CDim. Ces résultats suggèrent que les PDE ne peuvent initier la maturation des CDim en CD matures à l'inverse d'autres éléments de la MEC tels que l'acide hyaluronique ou l'ostéopontine (Renkl et al., 2005 ; Yang et al., 2002).

De plus, les peptides d'élastine perturbent la maturation des CD induite par le LPS et le TNF- α et orientent les CD vers un phénotype tolérogénique. Ainsi, en présence des PDE, les CD stimulées par le LPS et le TNF- α perdent la capacité d'induire la prolifération des lymphocytes T auxiliaires CD4⁺. Il existe différents mécanismes d'action des CD tolérogéniques aboutissant à l'inhibition de la prolifération des LT CD4⁺. Nous avons

démontré que les CD tolérogéniques induites par les PDE présentent *i)* une diminution de l'expression des molécules de co-stimulation nécessaires à l'induction d'une réponse lymphocytaire spécifique, *ii)* une augmentation d'un récepteur inhibiteur (ILT-3) et *iii)* une augmentation de la sécrétion de facteurs solubles induisant l'anergie des LT tels que les cytokines immunosuppressives (IL-10, TGF- β et IFN- α) et une enzyme dégradant le tryptophane (IDO). La maturation des CD en CD tolérogéniques en présence de PDE pourrait être la conséquence d'un effet anti-inflammatoire dispensé par ces peptides comme nous l'avons décrit sur les monocytes. En effet, de nombreuses molécules anti-inflammatoires induisent la formation de CD tolérogéniques et leurs effets s'exercent via l'inhibition de NF- κ B (Iruretagoyena et al., 2006 ; Lee et al., 1999). Ainsi, étant donné que les PDE inhibent la synthèse de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes via le blocage de l'activation de NF- κ B et que les CD dérivent de la différenciation des monocytes, nous pouvons suggérer que les PDE induisent un profil tolérogénique aux CD en inhibant l'activation de NF- κ B. Une autre explication possible à cet effet tolérogénique des PDE sur les CD pourrait être que ces peptides du Soi sont absents du thymus car ils sont séquestrés dans la molécule d'élastine. Ils échappent donc à la tolérance centrale et lors de leur apparition, consécutive à des dégradations de la MEC, un mécanisme de tolérance périphérique doit prendre en charge ces PDE afin de ne pas induire de réactions auto-immunes.

4. Rôles potentiels des PDE dans les pathologies inflammatoires chroniques.

4.1. PDE et rôles dans les pathologies inflammatoires chroniques artérielles et pulmonaires

Les pathologies inflammatoires chroniques artérielles (athérosclérose, AAA) et pulmonaires (BPCO) sont caractérisées par un afflux massif de différentes cellules inflammatoires et immunitaires (Finkelstein *et al.*, 1995 ; Libby., 2002). Ces cellules produisent des quantités importantes de médiateurs inflammatoires et notamment des protéases et des cytokines pro-inflammatoires (Eidelman *et al.*, 1990). Ces protéases participent aux dégradations tissulaires intenses, caractéristiques de ces pathologies, ce qui conduit à la production de peptides dispensant des activités biologiques (Maquart *et al.*, 2004). Ces tissus pulmonaires et artériels sont riches en fibres élastiques et des quantités importantes de peptides d'élastine sont retrouvées dans le sang périphérique des patients atteints d'athérosclérose et d'AAA (Petersen *et al.*, 2002) ainsi que dans les LBA des patients BPCO (Houghton *et al.*, 2006). Les données de la littérature mettent en évidence un rôle

global néfaste des peptides d'élastine au cours de ces pathologies car ils participent au recrutement chronique des cellules immunitaires (Grosso and Scott., 1993 ; Senior et al., 1984) et, à l'augmentation de la production de médiateurs inflammatoires par certaines cellules avoisinantes telles que les fibroblastes, les monocytes et les lymphocytes (Debret *et al.*, 2006 ; Jacob *et al.*, 1987). Par exemple, les PDE induisent la différenciation des LT vers un profil de type Th-1 néfaste dans l'athérosclérose (Debret *et al.*, 2006).

Les résultats que nous avons obtenus lors de ce travail semblent corroborer ces précédentes observations puisque nous avons montré que les PDE participent au recrutement des CDim et à la production de TNF- α et d'IL-12. Cette production de cytokines par les CDim pourrait être impliquée dans les pathologies inflammatoires chroniques i) via la différenciation des LT vers un profil Th-1 dispensant des effets délétères dans l'athérosclérose, et, ii) via leurs effets pro-inflammatoires propres, néfastes dans la BPCO et dans l'athérosclérose.

Par ailleurs, le facteur de transcription NF- κ B est impliqué dans de nombreux mécanismes observés lors des pathologies inflammatoires chroniques artérielles et pulmonaires notamment par i) la régulation de nombreux gènes de médiateurs de l'inflammation (Hayden *et al.*, 2006), et ii) par la régulation de l'apoptose des leucocytes (Ichikawa *et al.*, 2005). Or, nous avons montré dans ce travail que les PDE inhibent l'activation de NF- κ B et s'opposent ainsi aux effets du LPS sur la production des cytokines pro-inflammatoires par les monocytes humains. De plus, la régulation de l'apoptose par NF- κ B est à rapprocher de l'observation de l'induction de l'apoptose des lymphocytes, *in vitro*, par les PDE (Peterszegi *et al.*, 1999), ce qui pourrait également contribuer à la résolution de l'inflammation.

Ces effets anti-inflammatoires bénéfiques des PDE produits lors de l'athérosclérose, l'AAA ou la BPCO semblent contradictoires avec la plupart des données actuelles de la littérature mais sont à prendre en compte dans un environnement inflammatoire complexe qui perdure dans le temps et dans son intensité.

4.2. PDE et contrôle de la réponse inflammatoire et immunitaire au cours du mélanome.

La progression tumorale du mélanome est clairement associée à un processus inflammatoire chronique (Karin and Greten, 2005). Le mélanome évolue dans un environnement comprenant de nombreux médiateurs solubles qui influencent sa prolifération et sa progression. Ces facteurs peuvent être sécrétés par les cellules du mélanome elles-mêmes, par les cellules stromales ou encore par les cellules inflammatoires avoisinantes

(Lazar-Molnar *et al.*, 2000). Lors de l'invasion du derme par les cellules de mélanome, la MEC est dégradée. Cette dégradation libère de nombreux peptides solubles. En périphérie de la tumeur, une forte dégradation de l'élastine a été mise en évidence. Les PDE ainsi produits exercent une activité délétère sur le mélanome en augmentant son pouvoir invasif par le biais d'une intense production de MMP-2 (Ntayi *et al.*, 2004). Cependant, le rôle des PDE au cours du mélanome est controversé. Des données de la littérature indiquent que les PDE pourraient, via un effet activateur sur la production d'IL-1 β par les cellules du mélanome, participer à la progression de la tumeur (Debret *et al.*, 2006). D'autres études, au contraire, semblent indiquer que la production d'IL-1 β a des effets anti-tumoraux en favorisant, entre autres, la production d'IL-2 et d'IFN- γ , deux cytokines impliquées dans l'inhibition de la progression tumorale (Gansbacher *et al.*, 1990 ; Lai *et al.*, 1995).

En collaboration avec le Dr Debret, les résultats que nous avons obtenus au cours de ce travail de thèse suggèrent que les PDE pourraient s'opposer aux effets de l'IL-1 β sur les cellules de mélanomes et ainsi limiter d'une part les effets de la cytokine sur la progression tumorale, et, d'autre part, le processus inflammatoire auquel participe l'IL-1 β directement (effets pro-inflammatoires propres) ou indirectement (par le biais de la production de GRO- α et de l'IL-8) au cours du mélanome. Cependant, ces effets des PDE doivent être contrebalancés par leur capacité à induire la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-12) par les CDim au cours de la réponse immédiate.

Par ailleurs, l'inefficacité de l'immunité anti-tumorale au cours du mélanome peut être expliquée par le fait que les LT CD8⁺ présents au site tumoral peuvent présenter des défauts de maturation ne leur permettant pas une action cytolytique optimale contre les cellules tumorales (Mortarini *et al.*, 2003). Une explication à ce défaut de maturation pourrait être l'absence de lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires en quantité suffisante dans l'environnement de la tumeur. En effet, les lymphocytes T CD4⁺ Th-1 sont activement impliqués dans la phase de développement et de maturation des effecteurs cytotoxiques (Komenaka *et al.*, 2004). De plus, les LT CD4⁺ Th-1 pourraient également exercer, dans certaines conditions, une activité cytotoxique directe vis-à-vis des cellules de mélanome (Komenaka *et al.*, 2004).

Les résultats que nous avons obtenus au cours de ce travail ne semblent pas aller dans le sens d'un effet bénéfique des PDE sur la régulation de la composante immunitaire au cours du mélanome. En effet, nos résultats montrent que les PDE favorisent la différenciation des CDim vers un profil de CD tolérogéniques avec pour conséquences i) une réponse immunitaire orientée vers un profil cytokinique de type Th-2 qui semble peu efficace au cours

du mélanome, *ii*) la production de nombreuses cytokines à activités immuno-suppressives (IL-10, TGF- β , IFN- α), et, *iii*) une inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4⁺.

Finalement, il convient de garder à l'esprit que les effets des PDE au cours du mélanome ne peuvent être analysés que comme la résultante d'un équilibre subtil entre les différents effets de ces peptides sur les populations cellulaires impliquées au cours de la pathologie tumorale.

Conclusions et Perspectives

Dans ce travail nous avons étudié la régulation des monocytes et des cellules dendritiques par les produits de dégradation de l'élastine chez l'Homme.

Nous avons montré que les peptides d'élastine, en se liant à leur récepteur spécifique exprimé à la surface des monocytes, inhibent la production des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6) par les monocytes stimulés par le LPS. Cet effet est la conséquence de l'inhibition de l'activation de la voie de signalisation NF- κ B/I κ B- α en réponse à la stimulation du récepteur CD14/TLR-4 par le LPS. Ce mécanisme de régulation n'est pas spécifique aux monocytes puisque nous l'avons retrouvé dans le modèle du mélanome stimulé par l'IL-1 α . La caractérisation de l'ensemble des voies de signalisation impliquées dans ce phénomène devra être réalisée, notamment en étudiant les événements précoces conduisant à l'inhibition de la dégradation de I κ B- α . De plus, l'inhibition de l'activité d'autres récepteurs de l'inflammation par les PDE sera envisagée, en particulier l'activité d'autres TLR partageant des voies de signalisations communes avec le TLR4.

Dans le cas des CD, les PDE ont un effet chimio-attractant vis-à-vis des CD immatures. Cet effet qui est la conséquence de l'interaction des peptides avec le récepteur à l'élastine exprimé à la surface des CD s'accompagne de la synthèse de TNF- α et d'IL-12. Dans un contexte de maturation induite par le LPS et le TNF- α , les PDE orientent les CD vers un profil tolérogénique qui rend ces cellules incapables de stimuler la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires. L'étude des voies de signalisation impliquées dans ce mécanisme de régulation devra être réalisée. Nous focaliserons notre étude sur le facteur de transcription NF- κ B. En effet, les résultats que nous avons obtenus sur l'inhibition, par les peptides d'élastine, de la translocation nucléaire du facteur NF- κ B induite par le LPS dans les monocytes, associés aux données de la littérature montrant le rôle central de ce facteur de transcription dans la maturation des CD (Iruretagoyena et al., 2006 ; Li and Verma., 2002), nous conduisent à émettre l'hypothèse d'un rôle essentiel de ce facteur dans les effets des peptides d'élastine sur l'orientation de la différenciation des CD immatures vers un profil tolérogénique. Par ailleurs, nous étudierons le type de mécanisme de tolérance induit par les CD tolérogéniques obtenues sous l'effet des PDE, en caractérisant la nature des lymphocytes T (LT anergiques ou LT régulateurs) issus de l'interaction avec ces cellules tolérogéniques.

Nous étudierons également les effets régulateurs des peptides d'élastine *in vivo* dans des conditions se rapprochant de la réalité physiopathologique. Des travaux sont actuellement en cours dans notre laboratoire, afin d'étudier le rôle des peptides d'élastine dans la pathogénèse de la BPCO. En effet, une forte excrétion de desmosine, marqueur spécifique de la dégradation de l'élastine, et des taux élevés de peptides d'élastine dans différents liquides biologiques (urine, sang, plasma, expectorations) ont permis de mettre en évidence une dégradation intense de l'élastine pulmonaire chez les patients atteints de BPCO (Damiano et al., 1986 ; Gottlieb et al., 1996). De plus, le niveau de production de l'élastase du neutrophile dans les LBA de patients atteints d'emphysème est corrélé avec le niveau des peptides d'élastine dans ces mêmes fluides. En outre, l'utilisation d'un modèle expérimental d'emphysème murin a permis de montrer que les taux élevés de peptides d'élastine dans les LBA sont corrélés avec le recrutement de monocytes au niveau du parenchyme pulmonaire et la progression de la maladie emphysemateuse chez la souris (Houghton et al., 2006)

Nous disposons, dans notre laboratoire, de modèles de souris invalidées pour différentes sérines élastases spécifiques du PNN (élastase du neutrophile, cathepsine G, protéinase 3) qui sont activement impliquées dans la dégradation de l'élastine. Nous disposons également d'un modèle expérimental d'emphysème induit chez la souris par exposition à la fumée de cigarette (Shapiro et al., 2003). A partir de ces différents modèles, nous étudierons d'une part le rôle des sérines élastases dans la dégradation de l'élastine et la genèse des peptides d'élastine, et, d'autre part, le rôle des peptides d'élastine dans la régulation et le contrôle de l'inflammation pulmonaire. A partir des souris sauvages et des souris invalidées nous fractionnerons les LBA par HPLC et, nous identifierons les fractions ayant montré à la fois une activité chimiotactique vis-à-vis des PNN et/ou des lymphocytes T et la présence de peptides d'élastine. Les résultats obtenus seront comparés entre les souris sauvages et les souris invalidées pour les sérines élastases ce qui nous permettra d'identifier l'implication d'une ou de plusieurs de ces enzymes dans la genèse de peptides d'élastine à activité chimiotactique.

Dans un deuxième temps, nous confirmerons la contribution des produits de dégradation de l'élastine à engendrer une inflammation et/ou des lésions pulmonaires *in vivo*. Les fractions chimiotactiques préalablement sélectionnées seront administrées par voie intranasale à des souris sauvages et les paramètres de la réponse inflammatoire seront analysés. L'analyse histologique et l'étude des paramètres des lésions tissulaires seront réalisées sur les

poumons. Les changements au niveau de l'épithélium respiratoire (perte de l'intégrité, altérations des protéines de jonctions intercellulaires, exfoliation, dénudation de la membrane basale) seront étudiés par imagerie. Par ailleurs, la capacité des peptides d'élastine à moduler la réponse inflammatoire *in vivo* sera précisée en administrant des anticorps monoclonaux anti-élastine neutralisant avant et tout au long du protocole d'exposition à la fumée de cigarette des souris sauvages et en étudiant les paramètres de la réponse inflammatoire comme décrit ci-dessus.

L'ensemble du travail proposé devrait nous permettre de mieux comprendre le rôle des sérines élastases dans la genèse des peptides d'élastine au cours de la BPCO et les conséquences de la production de ces peptides sur le développement de cette pathologie.

Une approche clinique nous permettra également d'étudier la dynamique d'évolution de différents paramètres (sécrétion des cytokines, chimiotactisme, expression du récepteur S-gal) analysés sur différentes populations cellulaires (PNN et lymphocytes T) prélevés dans le sang circulant de sujets sains et de patients à différents stades de la BPCO. Enfin, une approche pharmacologique sera envisagée en étudiant la réponse des PNN et des lymphocytes T (chimiotactisme, activation cellulaire : mobilisation du calcium intracellulaire, production de cytokines et de protéases,...) à des motifs d'élastine actifs sélectionnés à partir de l'étude de relations structure/activité par modélisation moléculaire. Ceci devrait nous permettre d'identifier des motifs agonistes et antagonistes des effets des PDE sur la réaction inflammatoire.

Références bibliographiques

1. ACHYUTHAN,KE and ACHYUTHAN,AM.
Comparative enzymology, biochemistry and pathophysiology of human exo-alpha-sialidases (neuraminidases).
Comp Biochem.Physiol B Biochem.Mol.Biol. 2001 ; 129 :29-64.
2. AGGARWAL,BB, KOHR,WJ, HASS,PE, MOFFAT,B, SPENCER,SA, HENZEL,WJ et al.
Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization.
J.Biol.Chem. 1985 ; 260 :2345-2354.
3. AILAWADI,G, ELIASON,JL, and UPCHURCH,GR, Jr.
Current concepts in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm.
J.Vasc.Surg. 2003 ; 38 :584-588.
4. AKBARI,O, DEKRUYFF,RH, and UMETSU,DT.
Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen.
Nat.Immunol. 2001 ; 2 :725-731.
5. AKIRA,S, UEMATSU,S, and TAKEUCHI,O.
Pathogen recognition and innate immunity.
Cell 2006 ; 124 :783-801.
6. AKSOY,E, GOLDMAN,M, and WILLEMS,F.
Protein kinase C epsilon: a new target to control inflammation and immune-mediated disorders.
Int.J.Biochem.Cell Biol. 2004 ; 36 :183-188.
7. ALBERT,ML, JEGATHESAN,M, and DARNELL,RB.
Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells.
Nat.Immunol. 2001 ; 2 :1010-1017.
8. ALLAVENA,P, PIEMONTE,L, LONGONI,D, BERNASCONI,S, STOPPACCIARO,A, RUCO,L et al.
IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages.
Eur.J.Immunol. 1998 ; 28 :359-369.
9. ALMEIDA,J, BUENO,C, ALGUERO,MC, SANCHEZ,ML, DE SANTIAGO,M, ESCRIBANO,L et al.
Comparative analysis of the morphological, cytochemical, immunophenotypical, and functional characteristics of normal human peripheral blood lineage(-)/CD16(+)/HLA-DR(+)/CD14(-/lo) cells, CD14(+) monocytes, and CD16(-) dendritic cells.
Clin.Immunol. 2001 ; 100 :325-338.

10. ALVARO-GRACIA, JM, ZVAIFLER, NJ, and FIRESTEIN, GS.
Cytokines in chronic inflammatory arthritis. V. Mutual antagonism between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on HLA-DR expression, proliferation, collagenase production, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes.
J.Clin.Invest 1990 ; 86 :1790-1798.

11. ANSEL, J, PERRY, P, BROWN, J, DAMM, D, PHAN, T, HART, C et al.
Cytokine modulation of keratinocyte cytokines.
J.Invest Dermatol. 1990 ; 94 :101S-107S.

12. ARONHEIM, A.
Improved efficiency sos recruitment system: expression of the mammalian GAP reduces isolation of Ras GTPase false positives.
Nucleic Acids Res. 1997 ; 25 :3373-3374.

13. ARPINATI, M, GREEN, CL, HEIMFELD, S, HEUSER, JE, and ANASETTI, C.
Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells.
Blood 2000 ; 95 :2484-2490.

14. BABIK, JM, ADAMS, E, TONE, Y, FAIRCHILD, PJ, TONE, M, and WALDMANN, H.
Expression of murine IL-12 is regulated by translational control of the p35 subunit.
J.Immunol. 1999 ; 162 :4069-4078.

15. BAGRODIA, S, DERIJARD, B, DAVIS, RJ, and CERIONE, RA.
Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation.
J.Biol.Chem. 1995 ; 270 :27995-27998.

16. BALDWIN, AS, Jr.
The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights.
Annu.Rev.Immunol. 1996 ; 14 :649-683.

17. BANCHEREAU, J, BRIERE, F, CAUX, C, DAVOUST, J, LEBECQUE, S, LIU, YJ et al.
Immunobiology of dendritic cells.
Annu.Rev.Immunol. 2000 ; 18 :767-811.

18. BANCHEREAU, J and STEINMAN, RM.
Dendritic cells and the control of immunity.
Nature 1998 ; 392 :245-252.

19. BARNES, PJ.
Chronic obstructive pulmonary disease.
N.Engl.J.Med. 2000 ; 343 :269-280.

20. BASHIR, MM, INDIK, Z, YEH, H, ORNSTEIN-GOLDSTEIN, N, ROSENBLOOM, JC, ABRAMS, W et al.
Characterization of the complete human elastin gene. Delineation of unusual features in the 5'-flanking region.
J.Biol.Chem. 1989 ; 264 :8887-8891.

21. BAYDANOFF,S, NICOLOFF,G, and ALEXIEV,C.
Age-related changes in the level of circulating elastin-derived peptides in serum from normal and atherosclerotic subjects.
Atherosclerosis 1987 ; 66 :163-168.

22. BAZZONI,F and BEUTLER,B.
The tumor necrosis factor ligand and receptor families.
N.Engl.J.Med. 1996 ; 334 :1717-1725.

23. BELL,D, YOUNG,JW, and BANCHEREAU,J.
Dendritic cells.
Adv.Immunol. 1999 ; 72 :255-324.

24. BENDRISS-VERMARE,N, BARTHELEMY,C, DURAND,I, BRUAND,C, DEZUTTER-DAMBUYANT,C, MOULIAN,N et al.
Human thymus contains IFN-alpha-producing CD11c(-), myeloid CD11c(+), and mature interdigitating dendritic cells.
J.Clin.Invest 2001 ; 107 :835-844.

25. BENOIST,C and MATHIS,D.
Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry?
Nat.Immunol. 2001 ; 2 :797-801.

26. BERGWELT-BAILDON,MS, POPOV,A, SARIC,T, CHEMNITZ,J, CLASSEN,S, STOFFEL,MS et al.
CD25 and indoleamine 2,3-dioxygenase are up-regulated by prostaglandin E2 and expressed by tumor-associated dendritic cells in vivo: additional mechanisms of T-cell inhibition.
Blood 2006 ; 108 :228-237.

27. BETSUYAKU,T, NISHIMURA,M, YOSHIOKA,A, TAKEYABU,K, MIYAMOTO,K, and KAWAKAMI,Y.
Elastin-derived peptides and neutrophil elastase in bronchoalveolar lavage fluid.
Am.J.Respir.Crit Care Med. 1996 ; 154 :720-724.

28. BEUSCHER,HU, GUNTHER,C, and ROLLINGHOFF,M.
IL-1 beta is secreted by activated murine macrophages as biologically inactive precursor.
J.Immunol. 1990 ; 144 :2179-2183.

29. BEUTLER,BA.
The role of tumor necrosis factor in health and disease.
J.Rheumatol.Suppl 1999 ; 57 :16-21.

30. BISACCIA,F, CASTIGLIONE-MORELLI,MA, SPISANI,S, OSTUNI,A, SERAFINI-FRACASSINI,A, BAVOSO,A et al.
The amino acid sequence coded by the rarely expressed exon 26A of human elastin contains a stable beta-turn with chemotactic activity for monocytes.
Biochemistry 1998 ; 37 :11128-11135.

31. BISACCIA,F, MORELLI,MA, DE BIASI,M, TRANIELLO,S, SPISANI,S, and TAMBURRO,AM.

Migration of monocytes in the presence of elastolytic fragments of elastin and in synthetic derivatives. Structure-activity relationships.

Int.J.Pept.Protein Res. 1994 ; 44 :332-341.

32. BLACK,RA, KRONHEIM,SR, CANTRELL,M, DEELEY,MC, MARCH,CJ, PRICKETT,KS et al.

Generation of biologically active interleukin-1 beta by proteolytic cleavage of the inactive precursor.

J.Biol.Chem. 1988 ; 263 :9437-9442.

33. BLOM,B, HO,S, ANTONENKO,S, and LIU,YJ.

Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells.

J.Exp.Med. 2000 ; 192 :1785-1796.

34. BLOOD,CH, SASSE,J, BRODT,P, and ZETTER,BR.

Identification of a tumor cell receptor for VGVAPG, an elastin-derived chemotactic peptide.

J.Cell Biol. 1988 ; 107 :1987-1993.

35. BLOOD,CH and ZETTER,BR.

Membrane-bound protein kinase C modulates receptor affinity and chemotactic responsiveness of Lewis lung carcinoma sublines to an elastin-derived peptide.

J.Biol.Chem. 1989 ; 264 :10614-10620.

36. BOISE,LH, MINN,AJ, and THOMPSON,CB.

Receptors that regulate T-cell susceptibility to apoptotic cell death.

Ann.N.Y.Acad.Sci. 1995 ; 766 :70-80.

37. BOLLAND,S and RAVETCH,JV.

Inhibitory pathways triggered by ITIM-containing receptors.

Adv.Immunol. 1999 ; 72 :149-177.

38. BONDESON,J, BROWNE,KA, BRENNAN,FM, FOXWELL,BM, and FELDMANN,M.

Selective regulation of cytokine induction by adenoviral gene transfer of IkappaBalpha into human macrophages: lipopolysaccharide-induced, but not zymosan-induced, proinflammatory cytokines are inhibited, but IL-10 is nuclear factor-kappaB independent.

J.Immunol. 1999 ; 162 :2939-2945.

39. BONTEN,EJ, GALJART,NJ, WILLEMSSEN,R, USMANY,M, VLAK,JM, and D'AZZO,A.

Lysosomal protective protein/cathepsin A. Role of the "linker" domain in catalytic activation.

J.Biol.Chem. 1995 ; 270 :26441-26445.

40. BRASSART,B, FUCHS,P, HUET,E, ALIX,AJ, WALLACH,J, TAMBURRO,AM et al.

Conformational dependence of collagenase (matrix metalloproteinase-1) up-regulation by elastin peptides in cultured fibroblasts.

J.Biol.Chem. 2001 ; 276 :5222-5227.

41. BRAUN,D, GALIBERT,L, NAKAJIMA,T, SAITO,H, QUANG,VV, RUBIO,M et al.
Semimature stage: a checkpoint in a dendritic cell maturation program that allows for functional reversion after signal-regulatory protein-alpha ligation and maturation signals.
J.Immunol. 2006 ; 177 :8550-8559.
42. BRAUN,D, LONGMAN,RS, and ALBERT,ML.
A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation.
Blood 2005 ; 106 :2375-2381.
43. BRIGHTBILL,HD, PLEVY,SE, MODLIN,RL, and SMALE,ST.
A prominent role for Sp1 during lipopolysaccharide-mediated induction of the IL-10 promoter in macrophages.
J.Immunol. 2000 ; 164 :1940-1951.
44. BROWN,GD.
Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor.
Nat.Rev.Immunol. 2006 ; 6 :33-43.
45. BUCKLAND,M, JAGO,CB, FAZEKASOVA,H, SCOTT,K, TAN,PH, GEORGE,AJ et al.
Aspirin-treated human DCs up-regulate ILT-3 and induce hyporesponsiveness and regulatory activity in responder T cells.
Am.J.Transplant. 2006 ; 6 :2046-2059.
46. BURDIN,N and KRONENBERG,M.
CD1-mediated immune responses to glycolipids.
Curr.Opin.Immunol. 1999 ; 11 :326-331.
47. CALLAHAN,JW.
Molecular basis of GM1 gangliosidosis and Morquio disease, type B. Structure-function studies of lysosomal beta-galactosidase and the non-lysosomal beta-galactosidase-like protein.
Biochim.Biophys.Acta 1999 ; 1455 :85-103.
48. CANTOR,JO and SHTEYNGART,B.
How a test for elastic fiber breakdown products in sputum could speed development of a treatment for pulmonary emphysema.
Med.Sci.Monit. 2004 ; 10 :RA1-RA4.
49. CARRERAS,I, RICH,CB, PANCHENKO,MP, and FOSTER,JA.
Basic fibroblast growth factor decreases elastin gene transcription in aortic smooth muscle cells.
J.Cell Biochem. 2002 ; 85 :592-600.
50. CARSWELL,EA, OLD,LJ, KASSEL,RL, GREEN,S, FIORE,N, and WILLIAMSON,B.
An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1975 ; 72 :3666-3670.

51. CASSATELLA,MA, MEDA,L, GASPERINI,S, D'ANDREA,A, MA,X, and TRINCHIERI,G.
Interleukin-12 production by human polymorphonuclear leukocytes.
Eur.J.Immunol. 1995 ; 25 :1-5.
52. CATALDO,D, MUNAUT,C, NOEL,A, FRANKENNE,F, BARTSCH,P, FOIDART,JM et al.
MMP-2- and MMP-9-linked gelatinolytic activity in the sputum from patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease.
Int.Arch.Allergy Immunol. 2000 ; 123 :259-267.
53. CAUX,C, AIT-YAHIA,S, CHEMIN,K, DE BOUTEILLER,O, DIEU-NOSJEAN,MC, HOMEY,B et al.
Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines.
Springer Semin.Immunopathol. 2000 ; 22 :345-369.
54. CAUX,C, DEZUTTER-DAMBUYANT,C, SCHMITT,D, and BANCHEREAU,J.
GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells.
Nature 1992 ; 360 :258-261.
55. CAUX,C, VANBERVLIET,B, MASSACRIER,C, AIT-YAHIA,S, VAURE,C, CHEMIN,K et al.
Regulation of dendritic cell recruitment by chemokines.
Transplantation 2002 ; 73 :S7-11.
56. CAUX,C, VANBERVLIET,B, MASSACRIER,C, DEZUTTER-DAMBUYANT,C, SAINT-VIS,B, JACQUET,C et al.
CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha.
J.Exp.Med. 1996 ; 184 :695-706.
57. CAVAILLON,JM and HAEFFNER-CAVAILLON,N.
Signals involved in interleukin 1 synthesis and release by lipopolysaccharide-stimulated monocytes/macrophages.
Cytokine 1990 ; 2 :313-329.
58. CAVAILLON,JM and HAEFFNER-CAVAILLON,N.
[Cytokines and inflammation].
Rev.Prat. 1993 ; 43 :547-552.
59. CHANG,CC, CIUBOTARIU,R, MANAVALAN,JS, YUAN,J, COLOVAI,AI, PIAZZA,F et al.
Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4.
Nat.Immunol. 2002 ; 3 :237-243.
60. CHANG,EJ, KIM,HJ, HA,J, KIM,HJ, RYU,J, PARK,KH et al.
Hyaluronan inhibits osteoclast differentiation via Toll-like receptor 4.
J.Cell Sci. 2007 ; 120 :166-176.

61. CHEN,JH, LIU,TY, WU,CW, and CHI,CW.
Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for treatment of advanced gastric cancer: cyclooxygenase-2 is involved in hepatocyte growth factor mediated tumor development and progression.
Med.Hypotheses 2001 ; 57 :503-505.

62. CHEN,XP, DING,X, and DAYNES,RA.
Ganglioside control over IL-4 priming and cytokine production in activated T cells.
Cytokine 2000 ; 12 :972-985.

63. CHEN,XP, ENIOUTINA,EY, and DAYNES,RA.
The control of IL-4 gene expression in activated murine T lymphocytes: a novel role for neu-1 sialidase.
J.Immunol. 1997 ; 158 :3070-3080.

64. CHOPRA,RK, HOLBROOK,NJ, POWERS,DC, MCCOY,MT, ADLER,WH, and NAGEL,JE.
Interleukin 2, interleukin 2 receptor, and interferon-gamma synthesis and mRNA expression in phorbol myristate acetate and calcium ionophore A23187-stimulated T cells from elderly humans.
Clin.Immunol.Immunopathol. 1989 ; 53 :297-308.

65. CLARKE,AW and WEISS,AS.
Microfibril-associated glycoprotein-1 binding to tropoelastin: multiple binding sites and the role of divalent cations.
Eur.J.Biochem. 2004 ; 271 :3085-3090.

66. COHEN,JR, SARFATI,I, DANNA,D, and WISE,L.
Smooth muscle cell elastase, atherosclerosis, and abdominal aortic aneurysms.
Ann.Surg. 1992 ; 216 :327-330.

67. COHEN,N, MOULY,E, HAMDI,H, MAILLOT,MC, PALLARDY,M, GODOT,V et al.
GILZ expression in human dendritic cells redirects their maturation and prevents antigen-specific T lymphocyte response.
Blood 2006 ; 107 :2037-2044.

68. COLLINS,JF and FINE,R.
The enzymatic digestion of elastin at acidic pH.
Biochim.Biophys.Acta 1981 ; 657 :295-303.

69. COLONNA,M, NAKAJIMA,H, NAVARRO,F, and LOPEZ-BOTET,M.
A novel family of Ig-like receptors for HLA class I molecules that modulate function of lymphoid and myeloid cells.
J.Leukoc.Biol. 1999 ; 66 :375-381.

70. COLONNA,M, SAMARIDIS,J, CELLA,M, ANGMAN,L, ALLEN,RL, O'CALLAGHAN,CA et al.
Human myelomonocytic cells express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules.
J.Immunol. 1998 ; 160 :3096-3100.

71. CONN,KJ, RICH,CB, JENSEN,DE, FONTANILLA,MR, BASHIR,MM, ROSENBLOOM,J et al.
Insulin-like growth factor-I regulates transcription of the elastin gene through a putative retinoblastoma control element. A role for Sp3 acting as a repressor of elastin gene transcription.
J.Biol.Chem. 1996 ; 271 :28853-28860.

72. CORINTI,S, ALBANESI,C, LA SALA,A, PASTORE,S, and GIROLOMONI,G.
Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions.
J.Immunol. 2001 ; 166 :4312-4318.

73. CRAWFORD,K, GABUZDA,D, PANTAZOPOULOS,V, XU,J, CLEMENT,C, REINHERZ,E et al.
Circulating CD2+ monocytes are dendritic cells.
J.Immunol. 1999 ; 163 :5920-5928.

74. CYSTER,JG.
Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs.
Science 1999 ; 286 :2098-2102.

75. D'ELIOS,M and DEL PRETE,G.
Th1/Th2 balance in human disease.
Transplant.Proc. 1998 ; 30 :2373-2377.

76. DALGLEISH,AG and O'BYRNE,KJ.
Chronic immune activation and inflammation in the pathogenesis of AIDS and cancer.
Adv.Cancer Res. 2002 ; 84 :231-276.

77. DALPKE,A, ZIMMERMANN,S, and HEEG,K.
CpG DNA in the prevention and treatment of infections.
BioDrugs. 2002 ; 16 :419-431.

78. DAMIANO,VV, TSANG,A, KUCICH,U, ABRAMS,WR, ROSENBLOOM,J, KIMBEL,P et al.
Immunolocalization of elastase in human emphysematous lungs.
J.Clin.Invest 1986 ; 78 :482-493.

79. DAVIDSON,JM.
Smad about elastin regulation.
Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 2002 ; 26 :164-166.

80. DE FRAISSINETTE,A, SCHMITT,D, DEZUTTER-DAMBUYANT,C, GUYOTAT,D, ZABOT,MT, and THIVOLET,J.
Culture of putative Langerhans cell bone marrow precursors: characterization of their phenotype.
Exp.Hematol. 1988 ; 16 :764-768.

81. DE WAAL,MR, ABRAMS,J, BENNETT,B, FIGDOR,CG, and DE VRIES,JE.
Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes.
J.Exp.Med. 1991 ; 174 :1209-1220.

82. DE WAAL,MR, YSSEL,H, RONCAROLO,MG, SPITS,H, and DE VRIES,JE.
Interleukin-10.
Curr.Opin.Immunol. 1992 ; 4 :314-320.
83. DEBELLE,L and ALIX,AJ.
The structures of elastins and their function.
Biochimie 1999 ; 81 :981-994.
84. DEBELLE,L and TAMBURRO,AM.
Elastin: molecular description and function.
Int.J.Biochem.Cell Biol. 1999 ; 31 :261-272.
85. DEBRET,R, ANTONICELLI,F, THEILL,A, HORNEBECK,W, BERNARD,P, GUENOUNOU,M et al.
Elastin-derived peptides induce a T-helper type 1 polarization of human blood lymphocytes.
Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol. 2005 ; 25 :1353-1358.
86. DEBRET,R, LE NAOUR,RR, SALLENAVE,JM, DESHORGUE,A, HORNEBECK,WG, GUENOUNOU,M et al.
Elastin fragments induce IL-1beta upregulation via NF-kappaB pathway in melanoma cells.
J.Invest Dermatol. 2006 ; 126 :1860-1868.
87. DELGADO,M, REDUTA,A, SHARMA,V, and GANEA,D.
VIP/PACAP oppositely affects immature and mature dendritic cell expression of CD80/CD86 and the stimulatory activity for CD4(+) T cells.
J.Leukoc.Biol. 2004 ; 75 :1122-1130.
88. DENDORFER,U, OETTGEN,P, and LIBERMANN,TA.
Multiple regulatory elements in the interleukin-6 gene mediate induction by prostaglandins, cyclic AMP, and lipopolysaccharide.
Mol.Cell Biol. 1994 ; 14 :4443-4454.
89. DILLON,TJ, WALSH,RL, SCICCHITANO,R, ECKERT,B, CLEARY,EG, and MCLENNAN,G.
Plasma elastin-derived peptide levels in normal adults, children, and emphysematous subjects. Physiologic and computed tomographic scan correlates.
Am.Rev.Respir.Dis. 1992 ; 146 :1143-1148.
90. DINARELLO,CA.
Biology of interleukin 1.
FASEB J. 1988 ; 2 :108-115.
91. DINARELLO,CA.
The biological properties of interleukin-1.
Eur.Cytokine Netw. 1994 ; 5 :517-531.
92. DINARELLO,CA.
Proinflammatory cytokines.
Chest 2000 ; 118 :503-508.

93. DINARELLO,CA, CANNON,JG, MIER,JW, BERNHEIM,HA, LOPRESTE,G, LYNN,DL et al.
Multiple biological activities of human recombinant interleukin 1.
J.Clin.Invest 1986 ; 77 :1734-1739.

94. DING,L, LINSLEY,PS, HUANG,LY, GERMAIN,RN, and SHEVACH,EM.
IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression.
J.Immunol. 1993 ; 151 :1224-1234.

95. DOHERTY,DE, DOWNEY,GP, WORTHEN,GS, HASLETT,C, and HENSON,PM.
Monocyte retention and migration in pulmonary inflammation. Requirement for neutrophils.
Lab Invest 1988 ; 59 :200-213.

96. DOWNER,R, ROCHE,F, PARK,PW, MECHAM,RP, and FOSTER,TJ.
The elastin-binding protein of Staphylococcus aureus (EbpS) is expressed at the cell surface as an integral membrane protein and not as a cell wall-associated protein.
J.Biol.Chem. 2002 ; 277 :243-250.

97. DOYEN,V, RUBIO,M, BRAUN,D, NAKAJIMA,T, ABE,J, SAITO,H et al.
Thrombospondin 1 is an autocrine negative regulator of human dendritic cell activation.
J.Exp.Med. 2003 ; 198 :1277-1283.

98. DUCA,L, BLANCHEVOYE,C, CANTARELLI,B, GHONEIM,C, DEDIEU,S, DELACOUX,F et al.
The elastin receptor complex transduces signals through the catalytic activity of its neu-1 sub-unit.
J.Biol.Chem. 2007 ;

99. DUCA,L, DEBELLE,L, DEBRET,R, ANTONICELLI,F, HORNEBECK,W, and HAYE,B.
The elastin peptides-mediated induction of pro-collagenase-1 production by human fibroblasts involves activation of MEK/ERK pathway via PKA- and PI(3)K-dependent signaling.
FEBS Lett. 2002 ; 524 :193-198.

100. DUCA,L, FLOQUET,N, ALIX,AJ, HAYE,B, and DEBELLE,L.
Elastin as a matrikine.
Crit Rev.Oncol.Hematol. 2004 ; 49 :235-244.

101. DUCA,L, LAMBERT,E, DEBRET,R, ROTHHUT,B, BLANCHEVOYE,C, DELACOUX,F et al.
Elastin peptides activate extracellular signal-regulated kinase 1/2 via a Ras-independent mechanism requiring both p110gamma/Raf-1 and protein kinase A/B-Raf signaling in human skin fibroblasts.
Mol.Pharmacol. 2005 ; 67 :1315-1324.

102. DURKIN,HG and WAKSMAN,BH.
Thymus and tolerance. Is regulation the major function of the thymus?
Immunol.Rev. 2001 ; 182 :33-57.

103. DUSTIN,ML.
Impact of the immunological synapse on T cell signaling.
Results Probl.Cell Differ. 2006 ; 43 :175-198.

104. EIDELMAN,D, SAETTA,MP, GHEZZO,H, WANG,NS, HOIDAL,JR, KING,M
et al.
Cellularity of the alveolar walls in smokers and its relation to alveolar destruction. Functional implications.
Am.Rev.Respir.Dis. 1990 ; 141 :1547-1552.

105. ENGLISH,JM and COBB,MH.
Pharmacological inhibitors of MAPK pathways.
Trends Pharmacol.Sci. 2002 ; 23 :40-45.

106. ENK,AH, JONULEIT,H, SALOGA,J, and KNOP,J.
Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma.
Int.J.Cancer 1997 ; 73 :309-316.

107. FADOK,VA, BRATTON,DL, KONOWAL,A, FREED,PW, WESTCOTT,JY,
and HENSON,PM.
Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF.
J.Clin.Invest 1998 ; 101 :890-898.

108. FALB,D, BRINER,TJ, SUNSHINE,GH, BOURQUE,CR, LUQMAN,M,
GEFTER,ML et al.
Peripheral tolerance in T cell receptor-transgenic mice: evidence for T cell anergy.
Eur.J.Immunol. 1996 ; 26 :130-135.

109. FATHMAN,CG and LINEBERRY,NB.
Molecular mechanisms of CD4+ T-cell anergy.
Nat.Rev.Immunol. 2007 ; 7 :599-609.

110. FAURSCHOU,M and BORREGAARD,N.
Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation.
Microbes.Infect. 2003 ; 5 :1317-1327.

111. FAURY,G.
Role of the elastin-laminin receptor in the cardiovascular system.
Pathol.Biol.(Paris) 1998 ; 46 :517-526.

112. FAURY,G.
Function-structure relationship of elastic arteries in evolution: from microfibrils to elastin and elastic fibres.
Pathol.Biol.(Paris) 2001 ; 49 :310-325.

113. FAURY,G, GARNIER,S, WEISS,AS, WALLACH,J, FULOP,T, Jr., JACOB,MP
et al.
Action of tropoelastin and synthetic elastin sequences on vascular tone and on free Ca²⁺ level in human vascular endothelial cells.
Circ.Res. 1998 ; 82 :328-336.

114. FAZIO,MJ, MATTEI,MG, PASSAGE,E, CHU,ML, BLACK,D, SOLOMON,E et al.
Human elastin gene: new evidence for localization to the long arm of chromosome 7.
Am.J.Hum.Genet. 1991 ; 48 :696-703.
115. FENTON,MJ, VERMEULEN,MW, CLARK,BD, WEBB,AC, and AURON,PE.
Human pro-IL-1 beta gene expression in monocytic cells is regulated by two distinct pathways.
J.Immunol. 1988 ; 140 :2267-2273.
116. FINKELSTEIN,R, FRASER,RS, GHEZZO,H, and COSIO,MG.
Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers.
Am.J.Respir.Crit Care Med. 1995 ; 152 :1666-1672.
117. FIORENTINO,DF, BOND,MW, and MOSMANN,TR.
Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones.
J.Exp.Med. 1989 ; 170 :2081-2095.
118. FIORENTINO,DF, ZLOTNIK,A, MOSMANN,TR, HOWARD,M, and O'GARRA,A.
IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages.
J.Immunol. 1991 ; 147 :3815-3822.
119. FISHER,GJ, TALWAR,HS, LIN,J, LIN,P, MCPHILLIPS,F, WANG,Z et al.
Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin in vivo.
J.Clin.Invest 1998 ; 101 :1432-1440.
120. FLESCH,IE, HESS,JH, HUANG,S, AGUET,M, ROTHE,J, BLUETHMANN,H et al.
Early interleukin 12 production by macrophages in response to mycobacterial infection depends on interferon gamma and tumor necrosis factor alpha.
J.Exp.Med. 1995 ; 181 :1615-1621.
121. FOURNIER,M, LEBARGY,F, LE ROY,LF, LENORMAND,E, and PARIENTE,R.
Intraepithelial T-lymphocyte subsets in the airways of normal subjects and of patients with chronic bronchitis.
Am.Rev.Respir.Dis. 1989 ; 140 :737-742.
122. FRASER,JD, IRVING,BA, CRABTREE,GR, and WEISS,A.
Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28.
Science 1991 ; 251 :313-316.
123. FROSTEGARD,J, ULFGREN,AK, NYBERG,P, HEDIN,U, SWEDENBORG,J, ANDERSSON,U et al.
Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines.
Atherosclerosis 1999 ; 145 :33-43.

124. FRUMENTO,G, ROTONDO,R, TONETTI,M, DAMONTE,G, BENATTI,U, and FERRARA,GB.

Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase.
J.Exp.Med. 2002 ; 196 :459-468.

125. FUJIMOTO,N, AKAGI,A, and TAJIMA,S.

Expression of 67-kDa elastin receptor in annular elastolytic giant cell granuloma: elastin peptides induce monocyte-derived dendritic cells or macrophages to form granuloma in vitro.
Exp.Dermatol. 2004 ; 13 :179-184.

126. FUJIWARA,N and KOBAYASHI,K.

Macrophages in inflammation.
Curr.Drug Targets.Inflamm.Allergy 2005 ; 4 :281-286.

127. FULOP,T, Jr., JACOB,MP, VARGA,Z, FORIS,G, LEOVEY,A, and ROBERT,L.

Effect of elastin peptides on human monocytes: Ca²⁺ mobilization, stimulation of respiratory burst and enzyme secretion.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 1986 ; 141 :92-98.

128. FULOP,T, Jr., WEI,SM, ROBERT,L, and JACOB,MP.

Determination of elastin peptides in normal and arteriosclerotic human sera by ELISA.
Clin.Physiol Biochem. 1990 ; 8 :273-282.

129. GABAY,C, SMITH,MF, EIDLEN,D, and AREND,WP.

Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) is an acute-phase protein.
J.Clin.Invest 1997 ; 99 :2930-2940.

130. GABRILOVICH,DI, CIERNIK,IF, and CARBONE,DP.

Dendritic cells in antitumor immune responses. I. Defective antigen presentation in tumor-bearing hosts.
Cell Immunol. 1996 ; 170 :101-110.

131. GALIS,ZS and KHATRI,JJ.

Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly.
Circ.Res. 2002 ; 90 :251-262.

132. GALJART,NJ, MORREAU,H, WILLEMSSEN,R, GILLEMANS,N, BONTEN,EJ, and D'AZZO,A.

Human lysosomal protective protein has cathepsin A-like activity distinct from its protective function.
J.Biol.Chem. 1991 ; 266 :14754-14762.

133. GANGLOFF,SC, ZHRINGER,U, BLONDIN,C, GUENOUNOU,M, SILVER,J, and GOYERT,SM.

Influence of CD14 on ligand interactions between lipopolysaccharide and its receptor complex.
J.Immunol. 2005 ; 175 :3940-3945.

134. GANSBACHER,B, ZIER,K, DANIELS,B, CRONIN,K, BANNERJI,R, and GILBOA,E.

Interleukin 2 gene transfer into tumor cells abrogates tumorigenicity and induces protective immunity.

J.Exp.Med. 1990 ; 172 :1217-1224.

135. GARZON,R, SORIANO,SF, RODRIGUEZ-FRADE,JM, GOMEZ,L, MARTIN,dA, SANCHEZ-GOMEZ,M et al.

CXCR4-mediated suppressor of cytokine signaling up-regulation inactivates growth hormone function.

J.Biol.Chem. 2004 ; 279 :44460-44466.

136. GATELY,MK, DESAI,BB, WOLITZKY,AG, QUINN,PM, DWYER,CM, PODLASKI,FJ et al.

Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor).

J.Immunol. 1991 ; 147 :874-882.

137. GAULDIE,J, RICHARDS,C, HARNISH,D, LANSDORP,P, and BAUMANN,H.
Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells.

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1987 ; 84 :7251-7255.

138. GAY,NJ and KEITH,FJ.

Drosophila Toll and IL-1 receptor.

Nature 1991 ; 351 :355-356.

139. GEARING,AJ, BECKETT,P, CHRISTODOULOU,M, CHURCHILL,M, CLEMENTS,J, DAVIDSON,AH et al.

Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases.

Nature 1994 ; 370 :555-557.

140. GEISSMANN,F, REVY,P, REGNAULT,A, LEPELLETIER,Y, DY,M, BROUSSE,N et al.

TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells.

J.Immunol. 1999 ; 162 :4567-4575.

141. GEPPERT,TD, WHITEHURST,CE, THOMPSON,P, and BEUTLER,B.

Lipopolysaccharide signals activation of tumor necrosis factor biosynthesis through the ras/raf-1/MEK/MAPK pathway.

Mol.Med. 1994 ; 1 :93-103.

142. GERONDAKIS,S, GRUMONT,R, ROURKE,I, and GROSSMANN,M.

The regulation and roles of Rel/NF-kappa B transcription factors during lymphocyte activation.

Curr.Opin.Immunol. 1998 ; 10 :353-359.

143. GHUYSEN-ITARD,AF, ROBERT,L, and JACOB,MP.

[Effect of elastin peptides on cell proliferation].

C.R.Acad.Sci.III 1992 ; 315 :473-478.

144. GILLET-HLADKY,S, DE CARVALHO,CM, BERNAUD,J, BENDAHOUC, BLOY,C, and RIGAL,D.
Rabbit antithymocyte globulin inhibits monocyte-derived dendritic cells maturation in vitro and polarizes monocyte-derived dendritic cells towards tolerogenic dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase.
Transplantation 2006 ; 82 :965-974.
145. GIMMI,CD, FREEMAN,GJ, GRIBBEN,JG, GRAY,G, and NADLER,LM.
Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1993 ; 90 :6586-6590.
146. GONLUGUR,U and EFEOGLU,T.
Vascular adhesion and transendothelial migration of eosinophil leukocytes.
Cell Tissue Res. 2004 ; 318 :473-482.
147. GONZALEZ-REY,E, CHORNY,A, and DELGADO,M.
Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides.
Nat.Rev.Immunol. 2007 ; 7 :52-63.
148. GOTO,M, KATAYAMA,KI, SHIRAKAWA,F, and TANAKA,I.
Involvement of NF-kappaB p50/p65 heterodimer in activation of the human pro-interleukin-1beta gene at two subregions of the upstream enhancer element.
Cytokine 1999 ; 11 :16-28.
149. GOTTLIEB,DJ, STONE,PJ, SPARROW,D, GALE,ME, WEISS,ST, SNIDER,GL et al.
Urinary desmosine excretion in smokers with and without rapid decline of lung function: the Normative Aging Study.
Am.J.Respir.Crit Care Med. 1996 ; 154 :1290-1295.
150. GRAVES,KL and ROMAN,J.
Fibronectin modulates expression of interleukin-1 beta and its receptor antagonist in human mononuclear cells.
Am.J.Physiol 1996 ; 271 :L61-L69.
151. GRECH,AP, RIMINTON,DS, GABOR,MJ, HARDY,CL, SEDGWICK,JD, and GODFREY,DI.
Increased thymic B cells but maintenance of thymic structure, T cell differentiation and negative selection in lymphotoxin-alpha and TNF gene-targeted mice.
Dev.Immunol. 2000 ; 8 :61-74.
152. GROHMANN,U, FALLARINO,F, and PUC CETTI,P.
Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO.
Trends Immunol. 2003 ; 24 :242-248.
153. GRONSKI,TJ, Jr., MARTIN,RL, KOBAYASHI,DK, WALSH,BC, HOLMAN,MC, HUBER,M et al.
Hydrolysis of a broad spectrum of extracellular matrix proteins by human macrophage elastase.
J.Biol.Chem. 1997 ; 272 :12189-12194.

154. GROSSO,LE and MECHAM,RP.
In vitro processing of tropoelastin: investigation of a possible transport function associated with the carboxy-terminal domain.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 1988 ; 153 :545-551.
155. GROSSO,LE and SCOTT,M.
PGAIPG, a repeated hexapeptide of bovine and human tropoelastin, is chemotactic for neutrophils and Lewis lung carcinoma cells.
Arch.Biochem.Biophys. 1993 ; 305 :401-404.
156. GROUARD,G, RISSOAN,MC, FILGUEIRA,L, DURAND,I, BANCHEREAU,J, and LIU,YJ.
The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand.
J.Exp.Med. 1997 ; 185 :1101-1111.
157. GROUX,H, BIGLER,M, DE VRIES,JE, and RONCAROLO,MG.
Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells.
J.Exp.Med. 1996 ; 184 :19-29.
158. GROUX,H, O'GARRA,A, BIGLER,M, ROULEAU,M, ANTONENKO,S, DE VRIES,JE et al.
A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis.
Nature 1997 ; 389 :737-742.
159. GUHA,M and MACKMAN,N.
LPS induction of gene expression in human monocytes.
Cell Signal. 2001 ; 13 :85-94.
160. HACHICHA,M, RATHANASWAMI,P, SCHALL,TJ, and MCCOLL,SR.
Production of monocyte chemotactic protein-1 in human type B synoviocytes. Synergistic effect of tumor necrosis factor alpha and interferon-gamma.
Arthritis Rheum. 1993 ; 36 :26-34.
161. HAMBLETON,J, WEINSTEIN,SL, LEM,L, and DEFRANCO,AL.
Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1996 ; 93 :2774-2778.
162. HAN,J, LEE,JD, JIANG,Y, LI,Z, FENG,L, and ULEVITCH,RJ.
Characterization of the structure and function of a novel MAP kinase kinase (MKK6).
J.Biol.Chem. 1996 ; 271 :2886-2891.
163. HANADA,T and YOSHIMURA,A.
Regulation of cytokine signaling and inflammation.
Cytokine Growth Factor Rev. 2002 ; 13 :413-421.
164. HANCE,KA, TATARIA,M, ZIPORIN,SJ, LEE,JK, and THOMPSON,RW.
Monocyte chemotactic activity in human abdominal aortic aneurysms: role of elastin degradation peptides and the 67-kD cell surface elastin receptor.
J.Vasc.Surg. 2002 ; 35 :254-261.

165. HASDAY,JD, BASCOM,R, COSTA,JJ, FITZGERALD,T, and DUBIN,W.
Bacterial endotoxin is an active component of cigarette smoke.
Chest 1999 ; 115 :829-835.
166. HAUCK,M, SERES,I, KISS,I, SAULNIER,J, MOHACSI,A, WALLACH,J et al.
Effects of synthesized elastin peptides on human leukocytes.
Biochem.Mol.Biol.Int. 1995 ; 37 :45-55.
167. HAUTAMAKI,RD, KOBAYASHI,DK, SENIOR,RM, and SHAPIRO,SD.
Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice.
Science 1997 ; 277 :2002-2004.
168. HAYDEN,MS, WEST,AP, and GHOSH,S.
NF-kappaB and the immune response.
Oncogene 2006 ; 25 :6758-6780.
169. HEGUY,A, BALDARI,CT, MACCHIA,G, TELFORD,JL, and MELLI,M.
Amino acids conserved in interleukin-1 receptors (IL-1Rs) and the Drosophila toll protein are essential for IL-1R signal transduction.
J.Biol.Chem. 1992 ; 267 :2605-2609.
170. HELFGOTT,DC, MAY,LT, STHOEGER,Z, TAMM,I, and SEHGAL,PB.
Bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) enhances expression and secretion of beta 2 interferon by human fibroblasts.
J.Exp.Med. 1987 ; 166 :1300-1309.
171. HENRI,S, VREMEC,D, KAMATH,A, WAITHMAN,J, WILLIAMS,S, BENOIST,C et al.
The dendritic cell populations of mouse lymph nodes.
J.Immunol. 2001 ; 167 :741-748.
172. HERRERA-VELIT,P, KNUTSON,KL, and REINER,NE.
Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation of protein kinase C-zeta in bacterial lipopolysaccharide-treated human monocytes.
J.Biol.Chem. 1997 ; 272 :16445-16452.
173. HINEK,A.
Nature and the multiple functions of the 67-kD elastin-/laminin binding protein.
Cell Adhes.Comm. 1994 ; 2 :185-193.
174. HINEK,A.
The 67 kDa spliced variant of beta-galactosidase serves as a reusable protective chaperone for tropoelastin.
Ciba Found.Symp. 1995 ; 192 :185-191.
175. HINEK,A.
Biological roles of the non-integrin elastin/laminin receptor.
Biol.Chem. 1996 ; 377 :471-480.

176. HINEK,A, RABINOVITCH,M, KEELEY,F, OKAMURA-OHO,Y, and CALLAHAN,J.
The 67-kD elastin/laminin-binding protein is related to an enzymatically inactive, alternatively spliced form of beta-galactosidase.
J.Clin.Invest 1993 ; 91 :1198-1205.
177. HINEK,A, WRENN,DS, MECHAM,RP, and BARONDES,SH.
The elastin receptor: a galactoside-binding protein.
Science 1988 ; 239 :1539-1541.
178. HIRANO,T, YASUKAWA,K, HARADA,H, TAGA,T, WATANABE,Y, MATSUDA,T et al.
Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin.
Nature 1986 ; 324 :73-76.
179. HIROMATSU,Y and TODA,S.
Mast cells and angiogenesis.
Microsc.Res.Tech. 2003 ; 60 :64-69.
180. HISCOTT,J, MAROIS,J, GAROUFALIS,J, D'ADDARIO,M, ROULSTON,A, KWAN,I et al.
Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop.
Mol.Cell Biol. 1993 ; 13 :6231-6240.
181. HITCHCOCK,PJ, LEIVE,L, MAKELA,PH, RIETSCHEL,ET, STRITTMATTER,W, and MORRISON,DC.
Lipopolysaccharide nomenclature--past, present, and future.
J.Bacteriol. 1986 ; 166 :699-705.
182. HOEBE,K, JANSSEN,EM, KIM,SO, ALEXOPOULOU,L, FLAVELL,RA, HAN,J et al.
Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways.
Nat.Immunol. 2003 ; 4 :1223-1229.
183. HOFFMANN,JA.
Innate immunity of insects.
Curr.Opin.Immunol. 1995 ; 7 :4-10.
184. HONDA,K and TANIGUCHI,T.
IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors.
Nat.Rev.Immunol. 2006 ; 6 :644-658.
185. HORNEBECK,W, EMONARD,H, MONBOISSE,JC, and BELLON,G.
Matrix-directed regulation of pericellular proteolysis and tumor progression.
Semin.Cancer Biol. 2002 ; 12 :231-241.

186. HORNEBECK,W and ROBERT,L.
Elastase-like enzymes in aortas and human breast carcinomas: quantitative variations with age and pathology.
Adv.Exp.Med.Biol. 1977 ; 79 :145-164.

187. HORNEBECK,W, TIXIER,JM, and ROBERT,L.
Inducible adhesion of mesenchymal cells to elastic fibers: elastonectin.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1986 ; 83 :5517-5520.

188. HOUGHTON,AM, QUINTERO,PA, PERKINS,DL, KOBAYASHI,DK, KELLEY,DG, MARCONCINI,LA et al.
Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema.
J.Clin.Invest 2006 ; 116 :753-759.

189. HOWARD,AD, KOSTURA,MJ, THORNBERRY,N, DING,GJ, LIMJUCO,G, WEIDNER,J et al.
IL-1-converting enzyme requires aspartic acid residues for processing of the IL-1 beta precursor at two distinct sites and does not cleave 31-kDa IL-1 alpha.
J.Immunol. 1991 ; 147 :2964-2969.

190. HUANG,SL, SU,CH, and CHANG,SC.
Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in chronic bronchitis.
Am.J.Respir.Crit Care Med. 1997 ; 156 :1436-1439.

191. HUANG,YM, YANG,JS, XU,LY, LINK,H, and XIAO,BG.
Autoantigen-pulsed dendritic cells induce tolerance to experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in Lewis rats.
Clin.Exp.Immunol. 2000 ; 122 :437-444.

192. HUME,DA.
The mononuclear phagocyte system.
Curr.Opin.Immunol. 2006 ; 18 :49-53.

193. HUNNINGHAKE,GW, MONKS,BG, GEIST,LJ, MONICK,MM, MONROY,MA, STINSKI,MF et al.
The functional importance of a cap site-proximal region of the human prointerleukin 1 beta gene is defined by viral protein trans-activation.
Mol.Cell Biol. 1992 ; 12 :3439-3448.

194. IADEMARCO,MF, BARKS,JL, and DEAN,DC.
Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 expression by IL-4 and TNF-alpha in cultured endothelial cells.
J.Clin.Invest 1995 ; 95 :264-271.

195. ICHIKAWA,H, TAKADA,Y, MURAKAMI,A, and AGGARWAL,BB.
Identification of a novel blocker of I kappa B alpha kinase that enhances cellular apoptosis and inhibits cellular invasion through suppression of NF-kappa B-regulated gene products.
J.Immunol. 2005 ; 174 :7383-7392.

196. IMAI,K, DALAL,SS, CHEN,ES, DOWNEY,R, SCHULMAN,LL, GINSBURG,M et al.
Human collagenase (matrix metalloproteinase-1) expression in the lungs of patients with emphysema.
Am.J.Respir.Crit Care Med. 2001 ; 163 :786-791.
197. INDIK,Z, YEH,H, ORNSTEIN-GOLDSTEIN,N, SHEPPARD,P, ANDERSON,N, ROSENBLOOM,JC et al.
Alternative splicing of human elastin mRNA indicated by sequence analysis of cloned genomic and complementary DNA.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1987 ; 84 :5680-5684.
198. IRURETAGOYENA,MI, SEPULVEDA,SE, LEZANA,JP, HERMOSO,M, BRONFMAN,M, GUTIERREZ,MA et al.
Inhibition of nuclear factor-kappa B enhances the capacity of immature dendritic cells to induce antigen-specific tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 2006 ; 318 :59-67.
199. IWASAKI,M, MUKAI,T, GAO,P, PARK,WR, NAKAJIMA,C, TOMURA,M et al.
A critical role for IL-12 in CCR5 induction on T cell receptor-triggered mouse CD4(+) and CD8(+) T cells.
Eur.J.Immunol. 2001 ; 31 :2411-2420.
200. JACOB,MP, FULOP,T, Jr., FORIS,G, and ROBERT,L.
Effect of elastin peptides on ion fluxes in mononuclear cells, fibroblasts, and smooth muscle cells.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1987 ; 84 :995-999.
201. JACOB,MP, HORNEBECK,W, LAFUMA,C, BERNAUDIN,JF, ROBERT,L, and GODEAU,G.
Ultrastructural and biochemical modifications of rabbit arteries induced by immunization with soluble elastin peptides.
Exp.Mol.Pathol. 1984 ; 41 :171-190.
202. JACOB,MP, WEI,SM, GHUYSEN-ITARD,A, FULOP,T, and ROBERT,L.
[Elastin and arteriosclerosis: determination and characterization of elastin peptides in blood].
C.R.Seances Soc.Biol.Fil. 1992 ; 186 :342-348.
203. JANEWAY,CA, Jr.
Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology.
Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol. 1989 ; 54 Pt 1 :1-13.
204. JANEWAY,CA, Jr.
The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self.
Immunol.Today 1992 ; 13 :11-16.
205. JANEWAY,CA, Jr. and MEDZHITOV,R.
Innate immune recognition.
Annu.Rev.Immunol. 2002 ; 20 :197-216.

206. JIANG,W, SWIGGARD,WJ, HEUFLER,C, PENG,M, MIRZA,A, STEINMAN,RM et al.
The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing.
Nature 1995 ; 375 :151-155.

207. JONES,JD and DANGL,JL.
The plant immune system.
Nature 2006 ; 444 :323-329.

208. JONULEIT,H, ADEMA,G, and SCHMITT,E.
Immune regulation by regulatory T cells: implications for transplantation.
Transpl.Immunol. 2003 ; 11 :267-276.

209. JONULEIT,H, SCHMITT,E, STEINBRINK,K, and ENK,AH.
Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells.
Trends Immunol. 2001 ; 22 :394-400.

210. JORDAN,JA, HUFF,D, and DELOIA,JA.
Placental cellular immune response in women infected with human parvovirus B19 during pregnancy.
Clin.Diagn.Lab Immunol. 2001 ; 8 :288-292.

211. JUVONEN,T, PARKKILA,S, LEPOJARVI,M, and NIEMELA,O.
Demonstration of a bioactive elastin-derived peptide (Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly) in vascular lesions characterised by the segmental destruction of media.
Ann.Chir Gynaecol. 1994 ; 83 :296-302.

212. KAGAN,HM and CAI,P.
Isolation of active site peptides of lysyl oxidase.
Methods Enzymol. 1995 ; 258 :122-132.

213. KAHARI,VM, CHEN,YQ, BASHIR,MM, ROSENBLOOM,J, and UITTO,J.
Tumor necrosis factor-alpha down-regulates human elastin gene expression. Evidence for the role of AP-1 in the suppression of promoter activity.
J.Biol.Chem. 1992 ; 267 :26134-26141.

214. KAMISATO,S, UEMURA,Y, TAKAMI,N, and OKAMOTO,K.
Involvement of intracellular cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase in alpha-elastin-induced macrophage chemotaxis.
J.Biochem.(Tokyo) 1997 ; 121 :862-867.

215. KAMOUN,A, LANDEAU,JM, GODEAU,G, WALLACH,J, DUCHESNAY,A, PELLAT,B et al.
Growth stimulation of human skin fibroblasts by elastin-derived peptides.
Cell Adhes.Comm. 1995 ; 3 :273-281.

216. KAMRADT,T and MITCHISON,NA.
Tolerance and autoimmunity.
N.Engl.J.Med. 2001 ; 344 :655-664.

217. KAO,RC, WEHNER,NG, SKUBITZ,KM, GRAY,BH, and HOIDAL,JR.
Proteinase 3. A distinct human polymorphonuclear leukocyte proteinase that produces emphysema in hamsters.
J.Clin.Invest 1988 ; 82 :1963-1973.
218. KAPLANSKI,G, MARIN,V, MONTERO-JULIAN,F, MANTOVANI,A, and FARNARIER,C.
IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation.
Trends Immunol. 2003 ; 24 :25-29.
219. KARIN,M and BEN NERIAH,Y.
Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity.
Annu.Rev.Immunol. 2000 ; 18 :621-663.
220. KARIN,M and GRETEN,FR.
NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression.
Nat.Rev.Immunol. 2005 ; 5 :749-759.
221. KATO,T, HAKAMADA,R, YAMANE,H, and NARIUCHI,H.
Induction of IL-12 p40 messenger RNA expression and IL-12 production of macrophages via CD40-CD40 ligand interaction.
J.Immunol. 1996 ; 156 :3932-3938.
222. KAWAI,T and AKIRA,S.
TLR signaling.
Cell Death.Differ. 2006 ; 13 :816-825.
223. KAWAI,T and AKIRA,S.
TLR signaling.
Semin.Immunol. 2007 ; 19 :24-32.
224. KIM,JM, BRANNAN,CI, COPELAND,NG, JENKINS,NA, KHAN,TA, and MOORE,KW.
Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes.
J.Immunol. 1992 ; 148 :3618-3623.
225. KISHIMOTO,T.
The biology of interleukin-6.
Blood 1989 ; 74 :1-10.
226. KOBAYASHI,M, FITZ,L, RYAN,M, HEWICK,RM, CLARK,SC, CHAN,S et al.
Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes.
J.Exp.Med. 1989 ; 170 :827-845.
227. KOMENAKA,I, HOERIG,H, and KAUFMAN,HL.
Immunotherapy for melanoma.
Clin.Dermatol. 2004 ; 22 :251-265.

228. KONTNY,E, KUROWSKA,M, SZCZEPANSKA,K, and MASLINSKI,W.
Rottlerin, a PKC isozyme-selective inhibitor, affects signaling events and cytokine production in human monocytes.
J.Leukoc.Biol. 2000 ; 67 :249-258.
229. KOSKI,GK, LYAKH,LA, COHEN,PA, and RICE,NR.
CD14+ monocytes as dendritic cell precursors: diverse maturation-inducing pathways lead to common activation of NF-kappaB/RelB.
Crit Rev.Immunol. 2001 ; 21 :179-189.
230. KRIEGLER,M, PEREZ,C, DEFAY,K, ALBERT,I, and LU,SD.
A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF.
Cell 1988 ; 53 :45-53.
231. KRUEGER,JM, FANG,J, TAISHI,P, CHEN,Z, KUSHIKATA,T, and GARDI,J.
Sleep. A physiologic role for IL-1 beta and TNF-alpha.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 1998 ; 856 :148-159.
232. KRUMMEL,MF, SJAASTAD,MD, WULFING,C, and DAVIS,MM.
Differential clustering of CD4 and CD3zeta during T cell recognition.
Science 2000 ; 289 :1349-1352.
233. KUBIN,M, CHOW,JM, and TRINCHIERI,G.
Differential regulation of interleukin-12 (IL-12), tumor necrosis factor alpha, and IL-1 beta production in human myeloid leukemia cell lines and peripheral blood mononuclear cells.
Blood 1994 ; 83 :1847-1855.
234. KUPRASH,DV, UDALOVA,IA, TURETSKAYA,RL, KWIATKOWSKI,D, RICE,NR, and NEDOSPASOV,SA.
Similarities and differences between human and murine TNF promoters in their response to lipopolysaccharide.
J.Immunol. 1999 ; 162 :4045-4052.
235. KYRIAKIS,JM and AVRUCH,J.
Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation.
Physiol Rev. 2001 ; 81 :807-869.
236. LAI,NS, LAN,JL, YU,CL, and LIN,RH.
Role of tumor necrosis factor-alpha in the regulation of activated synovial T cell growth: down-regulation of synovial T cells in rheumatoid arthritis patients.
Eur.J.Immunol. 1995 ; 25 :3243-3248.
237. LANDOLFI,NF and COOK,RG.
Activated T-lymphocytes express class I molecules which are hyposialylated compared to other lymphocyte populations.
Mol.Immunol. 1986 ; 23 :297-309.

238. LARBI,A, LEVESQUE,G, ROBERT,L, GAGNE,D, DOUZIECH,N, and FULOP,T, Jr.
Presence and active synthesis of the 67 kDa elastin-receptor in human circulating white blood cells.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 2005 ; 332 :787-792.
239. LAZAR-MOLNAR,E, HEGYESI,H, TOTH,S, and FALUS,A.
Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma.
Cytokine 2000 ; 12 :547-554.
240. LE,JM, FREDRICKSON,G, POLLACK,M, and VILCEK,J.
Activation of thymocytes and T cells by interleukin-6.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 1989 ; 557 :444-452.
241. LECHMANN,M, ZINSER,E, GOLKA,A, and STEINKASSERER,A.
Role of CD83 in the immunomodulation of dendritic cells.
Int.Arch.Allergy Immunol. 2002 ; 129 :113-118.
242. LEE,JC, KASSIS,S, KUMAR,S, BADGER,A, and ADAMS,JL.
p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors--mechanisms and therapeutic potentials.
Pharmacol.Ther. 1999 ; 82 :389-397.
243. LESSER,M, PADILLA,ML, and CARDOZO,C.
Induction of emphysema in hamsters by intratracheal instillation of cathepsin B.
Am.Rev.Respir.Dis. 1992 ; 145 :661-668.
244. LEVINGS,MK and RONCAROLO,MG.
T-regulatory 1 cells: a novel subset of CD4 T cells with immunoregulatory properties.
J.Allergy Clin.Immunol. 2000 ; 106 :S109-S112.
245. LEVINGS,MK, SANGREGORIO,R, GALBIATI,F, SQUADRONE,S, DE WAAL,MR, and RONCAROLO,MG.
IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells.
J.Immunol. 2001 ; 166 :5530-5539.
246. LI,D, ZHENG,J, BAE,KT, WOODARD,PK, and HAACKE,EM.
Contrast-enhanced magnetic resonance imaging of the coronary arteries. A review.
Invest Radiol. 1998 ; 33 :578-586.
247. LI,L and BOUSSIOTIS,VA.
Physiologic regulation of central and peripheral T cell tolerance: lessons for therapeutic applications.
J.Mol.Med. 2006 ; 84 :887-899.
248. LI,Q and VERMA,IM.
NF-kappaB regulation in the immune system.
Nat.Rev.Immunol. 2002 ; 2 :725-734.
249. LIBBY,P.
Inflammation in atherosclerosis.
Nature 2002 ; 420 :868-874.

250. LIDINGTON,EA, MCCORMACK,AM, YACOUB,MH, and ROSE,ML.
The effects of monocytes on the transendothelial migration of T lymphocytes.
Immunology 1998 ; 94 :221-227.
251. LINDHOLT,JS, HEICKENDORFF,L, HENNEBERG,EW, and FASTING,H.
Serum-elastin-peptides as a predictor of expansion of small abdominal aortic aneurysms.
Eur.J.Vasc.Endovasc.Surg. 1997 ; 14 :12-16.
252. LIU,YJ and BLOM,B.
Introduction: TH2-inducing DC2 for immunotherapy.
Blood 2000 ; 95 :2482-2483.
253. LONG,MM, KING,VJ, PRASAD,KU, FREEMAN,BA, and URRY,DW.
Elastin repeat peptides as chemoattractants for bovine aortic endothelial cells.
J.Cell Physiol 1989 ; 140 :512-518.
254. LONG,MM, KING,VJ, PRASAD,KU, and URRY,DW.
Chemotaxis of fibroblasts toward nonapeptide of elastin.
Biochim.Biophys.Acta 1988 ; 968 :300-311.
255. LUDEWIG,B, GRAF,D, GELDERBLOM,HR, BECKER,Y, KROCZEK,RA, and PAULI,G.
Spontaneous apoptosis of dendritic cells is efficiently inhibited by TRAP (CD40-ligand) and TNF-alpha, but strongly enhanced by interleukin-10.
Eur.J.Immunol. 1995 ; 25 :1943-1950.
256. LUKONG,KE, SEYRANTEPE,V, LANDRY,K, TRUDEL,S, AHMAD,A, GAHL,WA et al.
Intracellular distribution of lysosomal sialidase is controlled by the internalization signal in its cytoplasmic tail.
J.Biol.Chem. 2001 ; 276 :46172-46181.
257. MA,X, CHOW,JM, GRI,G, CARRA,G, GEROSA,F, WOLF,SF et al.
The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells.
J.Exp.Med. 1996 ; 183 :147-157.
258. MA,Y, CHEN,Q, and ROSS,AC.
Retinoic acid and polyribonucleosinic:polyribocytidylic acid stimulate robust anti-tetanus antibody production while differentially regulating type 1/type 2 cytokines and lymphocyte populations.
J.Immunol. 2005 ; 174 :7961-7969.
259. MACATONIA,SE, HSIEH,CS, MURPHY,KM, and O'GARRA,A.
Dendritic cells and macrophages are required for Th1 development of CD4+ T cells from alpha beta TCR transgenic mice: IL-12 substitution for macrophages to stimulate IFN-gamma production is IFN-gamma-dependent.
Int.Immunol. 1993 ; 5 :1119-1128.

260. MAHNKE,K, RING,S, JOHNSON,TS, SCHALLENBERG,S, SCHONFELD,K, STORN,V et al.
Induction of immunosuppressive functions of dendritic cells in vivo by CD4+CD25+ regulatory T cells: role of B7-H3 expression and antigen presentation.
Eur.J.Immunol. 2007 ; 37 :2117-2126.
261. MANAVALAN,JS, ROSSI,PC, VLAD,G, PIAZZA,F, YARILINA,A, CORTESINI,R et al.
High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells.
Transpl.Immunol. 2003 ; 11 :245-258.
262. MAQUART,FX, PASCO,S, RAMONT,L, HORNEBECK,W, and MONBOISSE,JC.
An introduction to matrikines: extracellular matrix-derived peptides which regulate cell activity. Implication in tumor invasion.
Crit Rev.Oncol.Hematol. 2004 ; 49 :199-202.
263. MARAIS,R, WYNNE,J, and TREISMAN,R.
The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain.
Cell 1993 ; 73 :381-393.
264. MARSHALL,JD, SECRIST,H, DEKRUYFF,RH, WOLF,SF, and UMETSU,DT.
IL-12 inhibits the production of IL-4 and IL-10 in allergen-specific human CD4+ T lymphocytes.
J.Immunol. 1995 ; 155 :111-117.
265. MARTIN,MU and WESCHE,H.
Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family.
Biochim.Biophys.Acta 2002 ; 1592 :265-280.
266. MARTIN,P, DEL HOYO,GM, ANJUERE,F, ARIAS,CF, VARGAS,HH, FERNANDEZ,L et al.
Characterization of a new subpopulation of mouse CD8alpha+ B220+ dendritic cells endowed with type 1 interferon production capacity and tolerogenic potential.
Blood 2002 ; 100 :383-390.
267. MARTINON,F, BURNS,K, and TSCHOPP,J.
The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta.
Mol.Cell 2002 ; 10 :417-426.
268. MAUVIEL,A, CHEN,YQ, KAHARI,VM, LEDO,I, WU,M, RUDNICKA,L et al.
Human recombinant interleukin-1 beta up-regulates elastin gene expression in dermal fibroblasts. Evidence for transcriptional regulation in vitro and in vivo.
J.Biol.Chem. 1993 ; 268 :6520-6524.

269. MECHAM,RP, HINEK,A, ENTWISTLE,R, WRENN,DS, GRIFFIN,GL, and SENIOR,RM.
Elastin binds to a multifunctional 67-kilodalton peripheral membrane protein.
Biochemistry 1989 ; 28 :3716-3722.
270. MECHAM,RP, WHITEHOUSE,L, HAY,M, HINEK,A, and SHEETZ,MP.
Ligand affinity of the 67-kD elastin/laminin binding protein is modulated by the protein's lectin domain: visualization of elastin/laminin-receptor complexes with gold-tagged ligands.
J.Cell Biol. 1991 ; 113 :187-194.
271. MEDZHITOV,R and JANEWAY,C, Jr.
The Toll receptor family and microbial recognition.
Trends Microbiol. 2000 ; 8 :452-456.
272. MEDZHITOV,R and JANEWAY,CA, Jr.
Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition.
Cell 1997 ; 91 :295-298.
273. MELNICOFF,MJ, HORAN,PK, and MORAHAN,PS.
Kinetics of changes in peritoneal cell populations following acute inflammation.
Cell Immunol. 1989 ; 118 :178-191.
274. MITRA,RS, JUDGE,TA, NESTLE,FO, TURKA,LA, and NICKOLOFF,BJ.
Psoriatic skin-derived dendritic cell function is inhibited by exogenous IL-10. Differential modulation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression.
J.Immunol. 1995 ; 154 :2668-2677.
275. MIYAMOTO,T, OHNEDA,O, ARAI,F, IWAMOTO,K, OKADA,S, TAKAGI,K et al.
Bifurcation of osteoclasts and dendritic cells from common progenitors.
Blood 2001 ; 98 :2544-2554.
276. MOCHIZUKI,S, BRASSART,B, and HINEK,A.
Signaling pathways transduced through the elastin receptor facilitate proliferation of arterial smooth muscle cells.
J.Biol.Chem. 2002 ; 277 :44854-44863.
277. MOORE,KW, O'GARRA,A, DE WAAL,MR, VIEIRA,P, and MOSMANN,TR.
Interleukin-10.
Annu.Rev.Immunol. 1993 ; 11 :165-190.
278. MORELLI,AE and THOMSON,AW.
Dendritic cells: regulators of alloimmunity and opportunities for tolerance induction.
Immunol.Rev. 2003 ; 196 :125-146.
279. MOROY,G, ALIX,AJ, and HERY-HUYNH,S.
Structural characterization of human elastin derived peptides containing the GXXP sequence.
Biopolymers 2005 ; 78 :206-220.

280. MORREAU,H, GALJART,NJ, WILLEMSSEN,R, GILLEMANS,N, ZHOU,XY, and D'AZZO,A.
Human lysosomal protective protein. Glycosylation, intracellular transport, and association with beta-galactosidase in the endoplasmic reticulum.
J.Biol.Chem. 1992 ; 267 :17949-17956.
281. MORRIS,SC, MADDEN,KB, ADAMOVICZ,JJ, GAUSE,WC, HUBBARD,BR, GATELY,MK et al.
Effects of IL-12 on in vivo cytokine gene expression and Ig isotype selection.
J.Immunol. 1994 ; 152 :1047-1056.
282. MORTARINI,R, PIRIS,A, MAURICHI,A, MOLLA,A, BERSANI,I, BONO,A et al.
Lack of terminally differentiated tumor-specific CD8+ T cells at tumor site in spite of antitumor immunity to self-antigens in human metastatic melanoma.
Cancer Res. 2003 ; 63 :2535-2545.
283. MOSHAGE,HJ, ROELOFS,HM, VAN PELT,JF, HAZENBERG,BP, VAN LEEUWEN,MA, LIMBURG,PC et al.
The effect of interleukin-1, interleukin-6 and its interrelationship on the synthesis of serum amyloid A and C-reactive protein in primary cultures of adult human hepatocytes.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 1988 ; 155 :112-117.
284. MUELLER,RB, SKAPENKO,A, GRUNKE,M, WENDLER,J, STUHLMULLER,B, KALDEN,JR et al.
Regulation of myeloid cell function and major histocompatibility complex class II expression by tumor necrosis factor.
Arthritis Rheum. 2005 ; 52 :451-460.
285. MULLER,JM, ZIEGLER-HEITBROCK,HW, and BAEUERLE,PA.
Nuclear factor kappa B, a mediator of lipopolysaccharide effects.
Immunobiology 1993 ; 187 :233-256.
286. MUMMERT,ME, MUMMERT,D, EDELBAUM,D, HUI,F, MATSUE,H, and TAKASHIMA,A.
Synthesis and surface expression of hyaluronan by dendritic cells and its potential role in antigen presentation.
J.Immunol. 2002 ; 169 :4322-4331.
287. MURPHY,TL, CLEVELAND,MG, KULESZA,P, MAGRAM,J, and MURPHY,KM.
Regulation of interleukin 12 p40 expression through an NF-kappa B half-site.
Mol.Cell Biol. 1995 ; 15 :5258-5267.
288. NACKMAN,GB, KARKOWSKI,FJ, HALPERN,VJ, GAETZ,HP, and TILSON,MD.
Elastin degradation products induce adventitial angiogenesis in the Anidjar/Dobrin rat aneurysm model.
Surgery 1997 ; 122 :39-44.

289. NAITO,M, HASEGAWA,G, and TAKAHASHI,K.
Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells.
Microsc.Res.Tech. 1997 ; 39 :350-364.
290. NATHAN,C, SRIMAL,S, FARBER,C, SANCHEZ,E, KABBASH,L, ASCH,A et al.
Cytokine-induced respiratory burst of human neutrophils: dependence on extracellular matrix proteins and CD11/CD18 integrins.
J.Cell Biol. 1989 ; 109 :1341-1349.
291. NEDWIN,GE, NAYLOR,SL, SAKAGUCHI,AY, SMITH,D, JARRETT-NEDWIN,J, PENNICA,D et al.
Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization.
Nucleic Acids Res. 1985 ; 13 :6361-6373.
292. NIKAIDO,H.
Isolation of outer membranes.
Methods Enzymol. 1994 ; 235 :225-234.
293. NOMA,T, MIZUTA,T, ROSEN,A, HIRANO,T, KISHIMOTO,T, and HONJO,T.
Enhancement of the interleukin 2 receptor expression on T cells by multiple B-lymphotropic lymphokines.
Immunol.Lett. 1987 ; 15 :249-253.
294. NORBURY,CC, CHAMBERS,BJ, PRESCOTT,AR, LJUNGGREN,HG, and WATTS,C.
Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells.
Eur.J.Immunol. 1997 ; 27 :280-288.
295. NOVINEC,M, GRASS,RN, STARK,WJ, TURK,V, BAICI,A, and LENARCIC,B.
Interaction between human cathepsins K,L and S and elastins: Mechanism of elastinolysis and inhibition by macromolecular inhibitors.
J.Biol.Chem. 2007 ;
296. NTAYI,C, LABROUSSE,AL, DEBRET,R, BIREMBAUT,P, BELLON,G, ANTONICELLI,F et al.
Elastin-derived peptides upregulate matrix metalloproteinase-2-mediated melanoma cell invasion through elastin-binding protein.
J.Invest Dermatol. 2004 ; 122 :256-265.
297. O'CONNELL,MA, BENNETT,BL, MERCURIO,F, MANNING,AM, and MACKMAN,N.
Role of IKK1 and IKK2 in lipopolysaccharide signaling in human monocytic cells.
J.Biol.Chem. 1998 ; 273 :30410-30414.
298. O'MAHONY,A, LIN,X, GELEZIUNAS,R, and GREENE,WC.
Activation of the heterodimeric IkappaB kinase alpha (IKKalpha)-IKKbeta complex is directional: IKKalpha regulates IKKbeta under both basal and stimulated conditions.
Mol.Cell Biol. 2000 ; 20 :1170-1178.

299. OGAWA,S, LOZACH,J, BENNER,C, PASCUAL,G, TANGIRALA,RK, WESTIN,S et al.
Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors.
Cell 2005 ; 122 :707-721.
300. OLDENBORG,PA, ZHELEZNYAK,A, FANG,YF, LAGENAUR,CF, GRESHAM,HD, and LINDBERG,FP.
Role of CD47 as a marker of self on red blood cells.
Science 2000 ; 288 :2051-2054.
301. OOOYAMA,T, FUKUDA,K, ODA,H, NAKAMURA,H, and HIKITA,Y.
Substratum-bound elastin peptide inhibits aortic smooth muscle cell migration in vitro.
Arteriosclerosis 1987 ; 7 :593-598.
302. OPPMANN,B, LESLEY,R, BLOM,B, TIMANS,JC, XU,Y, HUNTE,B et al.
Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12.
Immunity. 2000 ; 13 :715-725.
303. OSAKABE,T, HAYASHI,M, HASEGAWA,K, OKUAKI,T, RITTY,TM, MECHAM,RP et al.
Age- and gender-related changes in ligament components.
Ann.Clin.Biochem. 2001 ; 38 :527-532.
304. OSUGI,Y, VUCKOVIC,S, and HART,DN.
Myeloid blood CD11c(+) dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells differ in their ability to stimulate T lymphocytes.
Blood 2002 ; 100 :2858-2866.
305. PACIFICI,R, CARANO,A, SANTORO,SA, RIFAS,L, JEFFREY,JJ, MALONE,JD et al.
Bone matrix constituents stimulate interleukin-1 release from human blood mononuclear cells.
J.Clin.Invest 1991 ; 87 :221-228.
306. PALUCKA,KA, TAQUET,N, SANCHEZ-CHAPUIS,F, and GLUCKMAN,JC.
Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation.
J.Immunol. 1998 ; 160 :4587-4595.
307. PANNU,R, WON,JS, KHAN,M, SINGH,AK, and SINGH,I.
A novel role of lactosylceramide in the regulation of lipopolysaccharide/interferon-gamma-mediated inducible nitric oxide synthase gene expression: implications for neuroinflammatory diseases.
J.Neurosci. 2004 ; 24 :5942-5954.
308. PARAMESWARAN,N, PAO,CS, LEONHARD,KS, KANG,DS, KRATZ,M, LEY,SC et al.
Arrestin-2 and G protein-coupled receptor kinase 5 interact with NFkappaB1 p105 and negatively regulate lipopolysaccharide-stimulated ERK1/2 activation in macrophages.
J.Biol.Chem. 2006 ; 281 :34159-34170.

309. PARDO,A, PEREZ-RAMOS,J, SEGURA-VALDEZ,L, RAMIREZ,R, and SELMAN,M.
Expression and localization of TIMP-1, TIMP-2, MMP-13, MMP-2, and MMP-9 in early and advanced experimental lung silicosis.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 1999 ; 878 :587-589.
310. PARDOLL,D.
Does the immune system see tumors as foreign or self?
Annu.Rev.Immunol. 2003 ; 21 :807-839.
311. PARKS,WC.
Posttranscriptional regulation of lung elastin production.
Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 1997 ; 17 :1-2.
312. PARTRIDGE,SM, DAVIS,HF, and ADAIR,GS.
The chemistry of connective tissues. 2. Soluble proteins derived from partial hydrolysis of elastin.
Biochem.J. 1955 ; 61 :11-21.
313. PASQUALI-RONCHETTI,I and BACCARANI-CONTRI,M.
Elastic fiber during development and aging.
Microsc.Res.Tech. 1997 ; 38 :428-435.
314. PETERSEN,E, BOMAN,J, WAGBERG,F, BERGSTROM,S, and ANGQUIST,KA.
In vitro degradation of aortic elastin by Chlamydia pneumoniae.
Eur.J.Vasc.Endovasc.Surg. 2001 ; 22 :443-447.
315. PETERSEN,E, WAGBERG,F, and ANGQUIST,KA.
Serum concentrations of elastin-derived peptides in patients with specific manifestations of atherosclerotic disease.
Eur.J.Vasc.Endovasc.Surg. 2002 ; 24 :440-444.
316. PETERSZEGI,G, ROBERT,AM, and ROBERT,L.
Presence of the elastin-laminin receptor on human activated lymphocytes.
C.R.Acad.Sci.III 1996 ; 319 :799-803.
317. PETERSZEGI,G, TEXIER,S, and ROBERT,L.
Cell death by overload of the elastin-laminin receptor on human activated lymphocytes: protection by lactose and melibiose.
Eur.J.Clin.Invest 1999 ; 29 :166-172.
318. PFLANZ,S, TIMANS,JC, CHEUNG,J, ROSALES,R, KANZLER,H, GILBERT,J et al.
IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells.
Immunity. 2002 ; 16 :779-790.
319. PICCIRILLO,CA and SHEVACH,EM.
Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells.
J.Immunol. 2001 ; 167 :1137-1140.

320. PIONTKIVSKA,H, ZHANG,Y, GREEN,ED, and ELNITSKI,L.
Multi-species sequence comparison reveals dynamic evolution of the elastin gene that has involved purifying selection and lineage-specific insertions/deletions.
BMC.Genomics 2004 ; 5 :31-
321. POGGI,P, CASASCO,A, MARCHETTI,C, CASASCO,M, CORNAGLIA,A, CALLIGARO,A et al.
Ultrastructural Localization of elastin-like immunoreactivity in the extracellular matrix around human small lymphatic vessels.
Lymphology 1995 ; 28 :189-195.
322. PRIVITERA,S, PRODY,CA, CALLAHAN,JW, and HINEK,A.
The 67-kDa enzymatically inactive alternatively spliced variant of beta-galactosidase is identical to the elastin/laminin-binding protein.
J.Biol.Chem. 1998 ; 273 :6319-6326.
323. QUARATINO,S, DUDDY,LP, and LONDEI,M.
Fully competent dendritic cells as inducers of T cell anergy in autoimmunity.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 2000 ; 97 :10911-10916.
324. QURESHI,ST, LARIVIERE,L, LEVEQUE,G, CLERMONT,S, MOORE,KJ, GROS,P et al.
Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4).
J.Exp.Med. 1999 ; 189 :615-625.
325. RAMJEESINGH,R, LEUNG,R, and SIU,CH.
Interleukin-8 secreted by endothelial cells induces chemotaxis of melanoma cells through the chemokine receptor CXCR1.
FASEB J. 2003 ; 17 :1292-1294.
326. RATHANASWAMI,P, HACHICHA,M, WONG,WL, SCHALL,TJ, and MCCOLL,SR.
Synergistic effect of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha on interleukin-8 gene expression in synovial fibroblasts. Evidence that interleukin-8 is the major neutrophil-activating chemokine released in response to monokine activation.
Arthritis Rheum. 1993 ; 36 :1295-1304.
327. REID,CD, FRYER,PR, CLIFFORD,C, KIRK,A, TIKERPAE,J, and KNIGHT,SC.
Identification of hematopoietic progenitors of macrophages and dendritic Langerhans cells (DL-CFU) in human bone marrow and peripheral blood.
Blood 1990 ; 76 :1139-1149.
328. REIS E SOUSA.
Dendritic cells in a mature age.
Nat.Rev.Immunol. 2006 ; 6 :476-483.
329. REIS E SOUSA, STAHL,PD, and AUSTYN,JM.
Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro.
J.Exp.Med. 1993 ; 178 :509-519.

330. REITAMO,S, REMITZ,A, TAMAI,K, LEDO,I, and UITTO,J.
Interleukin 10 up-regulates elastin gene expression in vivo and in vitro at the transcriptional level.
Biochem.J. 1994 ; 302 (Pt 2) :331-333.
331. RENKL,AC, WUSSLER,J, AHRENS,T, THOMA,K, KON,S, UEDE,T et al.
Osteopontin functionally activates dendritic cells and induces their differentiation toward a Th1-polarizing phenotype.
Blood 2005 ; 106 :946-955.
332. RES,PC, COUWENBERG,F, VYTH-DREESE,FA, and SPITS,H.
Expression of pTalpha mRNA in a committed dendritic cell precursor in the human thymus.
Blood 1999 ; 94 :2647-2657.
333. RIETSCHEL,ET, BRADE,H, BRADE,L, KACA,W, KAWAHARA,K, LINDNER,B et al.
Newer aspects of the chemical structure and biological activity of bacterial endotoxins.
Prog.Clin.Biol.Res. 1985 ; 189 :31-51.
334. RIETSCHEL,ET, BRADE,H, HOLST,O, BRADE,L, MULLER-LOENNIES,S, MAMAT,U et al.
Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification.
Curr.Top.Microbiol.Immunol. 1996 ; 216 :39-81.
335. RIOUX,JD and ABBAS,AK.
Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease.
Nature 2005 ; 435 :584-589.
336. RISSOAN,MC, SOUMELIS,V, KADOWAKI,N, GROUARD,G, BRIERE,F, DE WAAL,MR et al.
Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation.
Science 1999 ; 283 :1183-1186.
337. ROBERT,L, BIZBIZ,L, ALPEROVITCH,A, and BONITHON-KOPP,C.
[Elastolysis, aging and atherogenesis].
C.R.Seances Soc.Biol.Fil. 1995 ; 189 :853-859.
338. ROBINET,A, FAHEM,A, CAUCHARD,JH, HUET,E, VINCENT,L, LORIMIER,S et al.
Elastin-derived peptides enhance angiogenesis by promoting endothelial cell migration and tubulogenesis through upregulation of MT1-MMP.
J.Cell Sci. 2005 ; 118 :343-356.
339. ROLLI,M, KOTLYAROV,A, SAKAMOTO,KM, GAESTEL,M, and NEININGER,A.
Stress-induced stimulation of early growth response gene-1 by p38/stress-activated protein kinase 2 is mediated by a cAMP-responsive promoter element in a MAPKAP kinase 2-independent manner.
J.Biol.Chem. 1999 ; 274 :19559-19564.

340. ROMAGNANI,S, PARRONCHI,P, D'ELIOS,MM, ROMAGNANI,P, ANNUNZIATO,F, PICCINNI,MP et al.
An update on human Th1 and Th2 cells.
Int.Arch.Allergy Immunol. 1997 ; 113 :153-156.
341. ROMAN,J, RITZENTHALER,JD, PEREZ,RL, and ROSER,SL.
Differential modes of regulation of interleukin-1beta expression by extracellular matrices.
Immunology 1999 ; 98 :228-237.
342. ROSENBLOOM,J, ABRAMS,WR, and MECHAM,R.
Extracellular matrix 4: the elastic fiber.
FASEB J. 1993 ; 7 :1208-1218.
343. ROSENBLOOM,J, BASHIR,M, YEH,H, ROSENBLOOM,J, ORNSTEIN-GOLDSTEIN,N, FAZIO,M et al.
Regulation of elastin gene expression.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 1991 ; 624 :116-136.
344. SAKAGUCHI,S, NEGISHI,H, ASAGIRI,M, NAKAJIMA,C, MIZUTANI,T, TAKAOKA,A et al.
Essential role of IRF-3 in lipopolysaccharide-induced interferon-beta gene expression and endotoxin shock.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 2003 ; 306 :860-866.
345. SAKAGUCHI,S, SAKAGUCHI,N, SHIMIZU,J, YAMAZAKI,S, SAKIHAMA,T, ITOH,M et al.
Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance.
Immunol.Rev. 2001 ; 182 :18-32.
346. SAKAI,LY, KEENE,DR, and ENGVALL,E.
Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils.
J.Cell Biol. 1986 ; 103 :2499-2509.
347. SAKURAI,H, KOHSAKA,H, LIU,MF, HIGASHIYAMA,H, HIRATA,Y, KANNO,K et al.
Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides.
J.Clin.Invest 1995 ; 96 :2357-2363.
348. SALLUSTO,F, CELLA,M, DANIELI,C, and LANZAVECCHIA,A.
Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products.
J.Exp.Med. 1995 ; 182 :389-400.
349. SALLUSTO,F, SCHAEERLI,P, LOETSCHER,P, SCHANIEL,C, LENIG,D, MACKAY,CR et al.
Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation.
Eur.J.Immunol. 1998 ; 28 :2760-2769.

350. SANTIN,AD, HERMONAT,PL, RAVAGGI,A, CHIRIVA-INTERNATI,M, CANNON,MJ, HISERODT,JC et al.
Expression of surface antigens during the differentiation of human dendritic cells vs macrophages from blood monocytes in vitro.
Immunobiology 1999 ; 200 :187-204.
351. SAULNIER,JM, HAUCK,M, FULOP,T, Jr., and WALLACH,JM.
Human aortic elastin from normal individuals and atherosclerotic patients: lipid and cation contents; susceptibility to elastolysis.
Clin.Chim.Acta 1991 ; 200 :129-136.
352. SCHAEFER,L, BABELOVA,A, KISS,E, HAUSSER,HJ, BALIOVA,M, KRZYZANKOVA,M et al.
The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages.
J.Clin.Invest 2005 ; 115 :2223-2233.
353. SCHAEFFER,HJ and WEBER,MJ.
Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers.
Mol.Cell Biol. 1999 ; 19 :2435-2444.
354. SCHAFER,PH, GANDHI,AK, LOVELAND,MA, CHEN,RS, MAN,HW, SCHNETKAMP,PP et al.
Enhancement of cytokine production and AP-1 transcriptional activity in T cells by thalidomide-related immunomodulatory drugs.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 2003 ; 305 :1222-1232.
355. SCHEINECKER,C, MCHUGH,R, SHEVACH,EM, and GERMAIN,RN.
Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node.
J.Exp.Med. 2002 ; 196 :1079-1090.
356. SCHERLE,PA, JONES,EA, FAVATA,MF, DAULERIO,AJ, COVINGTON,MB, NURNBERG,SA et al.
Inhibition of MAP kinase kinase prevents cytokine and prostaglandin E2 production in lipopolysaccharide-stimulated monocytes.
J.Immunol. 1998 ; 161 :5681-5686.
357. SCHONBECK,U, MACH,F, and LIBBY,P.
Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing.
J.Immunol. 1998 ; 161 :3340-3346.
358. SCHONBECK,U, SUKHOVA,GK, GERDES,N, and LIBBY,P.
T(H)2 predominant immune responses prevail in human abdominal aortic aneurysm.
Am.J.Pathol. 2002 ; 161 :499-506.

359. SCHRIVER,EE, DAVIDSON,JM, SUTCLIFFE,MC, SWINDELL,BB, and BERNARD,GR.

Comparison of elastin peptide concentrations in body fluids from healthy volunteers, smokers, and patients with chronic obstructive pulmonary disease.

Am.Rev.Respir.Dis. 1992 ; 145 :762-766.

360. SCHUMANN,RR, LEONG,SR, FLAGGS,GW, GRAY,PW, WRIGHT,SD, MATHISON,JC et al.

Structure and function of lipopolysaccharide binding protein.

Science 1990 ; 249 :1429-1431.

361. SCHWARTZ,YS and DUSHKIN,MI.

Endotoxin-lipoprotein complex formation as a factor in atherogenesis: associations with hyperlipidemia and with lecithin:cholesterol acyltransferase activity.

Biochemistry (Mosc.) 2002 ; 67 :747-752.

362. SEGURA-VALDEZ,L, PARDO,A, GAXIOLA,M, UHAL,BD, BECERRIL,C, and SELMAN,M.

Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD.

Chest 2000 ; 117 :684-694.

363. SELMAN,M, CISNEROS-LIRA,J, GAXIOLA,M, RAMIREZ,R, KUDLACZ,EM, MITCHELL,PG et al.

Matrix metalloproteinases inhibition attenuates tobacco smoke-induced emphysema in Guinea pigs.

Chest 2003 ; 123 :1633-1641.

364. SENIOR,RM, GRIFFIN,GL, and MECHAM,RP.

Chemotactic activity of elastin-derived peptides.

J.Clin.Invest 1980 ; 66 :859-862.

365. SENIOR,RM, GRIFFIN,GL, and MECHAM,RP.

Chemotactic responses of fibroblasts to tropoelastin and elastin-derived peptides.

J.Clin.Invest 1982 ; 70 :614-618.

366. SENIOR,RM, GRIFFIN,GL, MECHAM,RP, WRENN,DS, PRASAD,KU, and URRY,DW.

Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly, a repeating peptide in elastin, is chemotactic for fibroblasts and monocytes.

J.Cell Biol. 1984 ; 99 :870-874.

367. SENIOR,RM, HINEK,A, GRIFFIN,GL, PIPOLY,DJ, CROUCH,EC, and MECHAM,RP.

Neutrophils show chemotaxis to type IV collagen and its 7S domain and contain a 67 kD type IV collagen binding protein with lectin properties.

Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 1989 ; 1 :479-487.

368. SERVET-DELPRAT,C, ARNAUD,S, JURDIC,P, NATAF,S, GRASSET,MF, SOULAS,C et al.
Flt3+ macrophage precursors commit sequentially to osteoclasts, dendritic cells and microglia.
BMC.Immunol. 2002 ; 3 :15-
369. SETA,N and KUWANA,M.
Human circulating monocytes as multipotential progenitors.
Keio J.Med. 2007 ; 56 :41-47.
370. SEYA,T, OSHIUMI,H, SASAI,M, AKAZAWA,T, and MATSUMOTO,M.
TICAM-1 and TICAM-2: toll-like receptor adapters that participate in induction of type 1 interferons.
Int.J.Biochem.Cell Biol. 2005 ; 37 :524-529.
371. SEYRANTEPE,V, POUPETOVA,H, FROISSART,R, ZABOT,MT, MAIRE,I, and PSHEZHETSKY,AV.
Molecular pathology of NEU1 gene in sialidosis.
Hum.Mutat. 2003 ; 22 :343-352.
372. SHAPIRO,SD.
Mighty mice: transgenic technology "knocks out" questions of matrix metalloproteinase function.
Matrix Biol. 1997 ; 15 :527-533.
373. SHAPIRO,SD, ENDICOTT,SK, PROVINCE,MA, PIERCE,JA, and CAMPBELL,EJ.
Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence of D-aspartate and nuclear weapons-related radiocarbon.
J.Clin.Invest 1991 ; 87 :1828-1834.
374. SHAPIRO,SD, GOLDSTEIN,NM, HOUGHTON,AM, KOBAYASHI,DK, KELLEY,D, and BELAAOUAJ,A.
Neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-induced emphysema in mice.
Am.J.Pathol. 2003 ; 163 :2329-2335.
375. SHERWOOD,ER and TOLIVER-KINSKY,T.
Mechanisms of the inflammatory response.
Best.Pract.Res.Clin.Anaesthesiol. 2004 ; 18 :385-405.
376. SHEVACH,EM, MCHUGH,RS, PICCIRILLO,CA, and THORNTON,AM.
Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells.
Immunol.Rev. 2001 ; 182 :58-67.
377. SHIMAZU,R, AKASHI,S, OGATA,H, NAGAI,Y, FUKUDOME,K, MIYAKE,K et al.
MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4.
J.Exp.Med. 1999 ; 189 :1777-1782.
378. SHIMIZU,K, MITCHELL,RN, and LIBBY,P.
Inflammation and cellular immune responses in abdominal aortic aneurysms.
Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol. 2006 ; 26 :987-994.

379. SHIMIZU,K, SHICHIRI,M, LIBBY,P, LEE,RT, and MITCHELL,RN.
Th2-predominant inflammation and blockade of IFN-gamma signaling induce aneurysms in allografted aortas.
J.Clin.Invest 2004 ; 114 :300-308.
380. SHU,U, KINIWA,M, WU,CY, MALISZEWSKI,C, VEZZIO,N, HAKIMI,J et al.
Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction.
Eur.J.Immunol. 1995 ; 25 :1125-1128.
381. SIMIONESCU,A, PHILIPS,K, and VYAVAHARE,N.
Elastin-derived peptides and TGF-beta1 induce osteogenic responses in smooth muscle cells.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 2005 ; 334 :524-532.
382. SIWIK,DA, CHANG,DL, and COLUCCI,WS.
Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro.
Circ.Res. 2000 ; 86 :1259-1265.
383. SORG,RV, KOGLER,G, and WERNET,P.
Identification of cord blood dendritic cells as an immature CD11c- population.
Blood 1999 ; 93 :2302-2307.
384. SOSMAN,JA and PUZANOV,I.
Molecular targets in melanoma from angiogenesis to apoptosis.
Clin.Cancer Res. 2006 ; 12 :2376s-2383s.
385. SOZZANI,S, ALLAVENA,P, D'AMICO,G, LUINI,W, BIANCHI,G, KATAURA,M et al.
Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties.
J.Immunol. 1998 ; 161 :1083-1086.
386. SPITS,H, COUWENBERG,F, BAKKER,AQ, WEIJER,K, and UITTENBOGAART,CH.
Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2.
J.Exp.Med. 2000 ; 192 :1775-1784.
387. STAMATOS,NM, CURRELI,S, ZELLA,D, and CROSS,AS.
Desialylation of glycoconjugates on the surface of monocytes activates the extracellular signal-related kinases ERK 1/2 and results in enhanced production of specific cytokines.
J.Leukoc.Biol. 2004 ; 75 :307-313.
388. STARCHER,BC.
Lung elastin and matrix.
Chest 2000 ; 117 :229S-234S.

389. STEINBRINK,K, JONULEIT,H, MULLER,G, SCHULER,G, KNOP,J, and ENK,AH.
Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells.
Blood 1999a ; 93 :1634-1642.
390. STEINBRINK,K, PIOR,J, VOGL,T, SORG,C, and MACHER,E.
Contact tolerance.
Pathobiology 1999b ; 67 :311-313.
391. STEINBRINK,K, WOLFL,M, JONULEIT,H, KNOP,J, and ENK,AH.
Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells.
J.Immunol. 1997 ; 159 :4772-4780.
392. STEINMAN,RM and COHN,ZA.
Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution.
J.Exp.Med. 1973 ; 137 :1142-1162.
393. STEINMAN,RM, HAWIGER,D, LIU,K, BONIFAZ,L, BONNYAY,D, MAHNKE,K et al.
Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 2003a ; 987 :15-25.
394. STEINMAN,RM, HAWIGER,D, and NUSSENZWEIG,MC.
Tolerogenic dendritic cells.
Annu.Rev.Immunol. 2003b ; 21 :685-711.
395. STEINMAN,RM and NUSSENZWEIG,MC.
Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 2002 ; 99 :351-358.
396. STEMME,S, RYMO,L, and HANSSON,GK.
Polyclonal origin of T lymphocytes in human atherosclerotic plaques.
Lab Invest 1991 ; 65 :654-660.
397. STOLLER,JK.
Alpha-1 antitrypsin deficiency: an under-recognized but important issue for respiratory therapists.
Respir.Care 2003 ; 48 :1022-1024.
398. SUDA,T, TAKAHASHI,T, GOLSTEIN,P, and NAGATA,S.
Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family.
Cell 1993 ; 75 :1169-1178.
399. SUKHOVA,GK, WANG,B, LIBBY,P, PAN,JH, ZHANG,Y, GRUBB,A et al.
Cystatin C deficiency increases elastic lamina degradation and aortic dilatation in apolipoprotein E-null mice.
Circ.Res. 2005 ; 96 :368-375.

400. SURI-PAYER,E, AMAR,AZ, THORNTON,AM, and SHEVACH,EM.
CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells.
J.Immunol. 1998 ; 160 :1212-1218.
401. SWEET,MJ and HUME,DA.
Endotoxin signal transduction in macrophages.
J.Leukoc.Biol. 1996 ; 60 :8-26.
402. SYPEK,JP, CHUNG,CL, MAYOR,SE, SUBRAMANYAM,JM, GOLDMAN,SJ, SIEBURTH,DS et al.
Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response.
J.Exp.Med. 1993 ; 177 :1797-1802.
403. SZABO,Z, LEVI-MINZI,SA, CHRISTIANO,AM, STRUMINGER,C, STONEKING,M, BATZER,MA et al.
Sequential loss of two neighboring exons of the tropoelastin gene during primate evolution.
J.Mol.Evol. 1999 ; 49 :664-671.
404. TADA,K, TANAKA,M, HANAYAMA,R, MIWA,K, SHINOHARA,A, IWAMATSU,A et al.
Tethering of apoptotic cells to phagocytes through binding of CD47 to Src homology 2 domain-bearing protein tyrosine phosphatase substrate-1.
J.Immunol. 2003 ; 171 :5718-5726.
405. TAJIMA,S, WACHI,H, UEMURA,Y, and OKAMOTO,K.
Modulation by elastin peptide VGVAPG of cell proliferation and elastin expression in human skin fibroblasts.
Arch.Dermatol.Res. 1997 ; 289 :489-492.
406. TEDGUI,A and MALLAT,Z.
Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall.
Circ.Res. 2001 ; 88 :877-887.
407. TERNESS,P, BAUER,TM, ROSE,L, DUFTER,C, WATZLIK,A, SIMON,H et al.
Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites.
J.Exp.Med. 2002 ; 196 :447-457.
408. TOBOREK,M and HENNIG,B.
Vitamin E attenuates induction of elastase-like activity by tumor necrosis factor-alpha, cholestan-3 beta,5 alpha,6 beta-triol and linoleic acid in cultured endothelial cells.
Clin.Chim.Acta 1993 ; 215 :201-211.
409. TRIANTAFILOU,M, MIYAKE,K, GOLENBOCK,DT, and TRIANTAFILOU,K.
Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation.
J.Cell Sci. 2002 ; 115 :2603-2611.

410. TRINCHIERI,G.
Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity.
Nat.Rev.Immunol. 2003 ; 3 :133-146.
411. TURVEY,SE and HAWN,TR.
Towards subtlety: understanding the role of Toll-like receptor signaling in susceptibility to human infections.
Clin.Immunol. 2006 ; 120 :1-9.
412. UEMURA,Y and OKAMOTO,K.
Elastin-derived peptide induces monocyte chemotaxis by increasing intracellular cyclic GMP level and activating cyclic GMP dependent protein kinase.
Biochem.Mol.Biol.Int. 1997 ; 41 :57-64.
413. UITTO,J, CHRISTIANO,AM, KAHARI,VM, BASHIR,MM, and ROSENBLOOM,J.
Molecular biology and pathology of human elastin.
Biochem.Soc.Trans. 1991 ; 19 :824-829.
414. UMEDA,H, NAKAMURA,F, and SUYAMA,K.
Oxodesmosine and isooxodesmosine, candidates of oxidative metabolic intermediates of pyridinium cross-links in elastin.
Arch.Biochem.Biophys. 2001 ; 385 :209-219.
415. URRY,DW, LONG,MM, and SUGANO,H.
Cyclic analog of elastin polyhexapeptide exhibits an inverse temperature transition leading to crystallization.
J.Biol.Chem. 1978 ; 253 :6301-6302.
416. UTSUGI,M, DOBASHI,K, ISHIZUKA,T, KAWATA,T, HISADA,T, SHIMIZU,Y et al.
Rac1 negatively regulates lipopolysaccharide-induced IL-23 p19 expression in human macrophages and dendritic cells and NF-kappaB p65 trans activation plays a novel role.
J.Immunol. 2006 ; 177 :4550-4557.
417. VADAY,GG and LIDER,O.
Extracellular matrix moieties, cytokines, and enzymes: dynamic effects on immune cell behavior and inflammation.
J.Leukoc.Biol. 2000 ; 67 :149-159.
418. VAN DER,SA, BONTEN,E, and D'AZZO,A.
Transport of human lysosomal neuraminidase to mature lysosomes requires protective protein/cathepsin A.
EMBO J. 1998 ; 17 :1588-1597.
419. VAN PARIJS,L, PEREZ,VL, and ABBAS,AK.
Mechanisms of peripheral T cell tolerance.
Novartis.Found.Symp. 1998 ; 215 :5-14.
420. VAN SNICK,J.
Interleukin-6: an overview.
Annu.Rev.Immunol. 1990 ; 8 :253-278.

421. VANBERVLIET,B, HOMEY,B, DURAND,I, MASSACRIER,C, AIT-YAHIA,S, DE BOUTEILLER,O et al.
Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces.
Eur.J.Immunol. 2002 ; 32 :231-242.
422. VARGA,Z, JACOB,MP, CSONGOR,J, ROBERT,L, LEOVEY,A, and FULOP,T, Jr.
Altered phosphatidylinositol breakdown after K-elastin stimulation in PMNLs of elderly.
Mech.Ageing Dev. 1990 ; 52 :61-70.
423. VARGA,Z, JACOB,MP, ROBERT,L, and FULOP,T, Jr.
Identification and signal transduction mechanism of elastin peptide receptor in human leukocytes.
FEBS Lett. 1989 ; 258 :5-8.
424. VARNEY,ML, LI,A, DAVE,BJ, BUCANA,CD, JOHANSSON,SL, and SINGH,RK.
Expression of CXCR1 and CXCR2 receptors in malignant melanoma with different metastatic potential and their role in interleukin-8 (CXCL-8)-mediated modulation of metastatic phenotype.
Clin.Exp.Metastasis 2003 ; 20 :723-731.
425. VISINTIN,A, MAZZONI,A, SPITZER,JH, WYLLIE,DH, DOWER,SK, and SEGAL,DM.
Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells.
J.Immunol. 2001 ; 166 :249-255.
426. VLAHOS,R, BOZINOVSKI,S, JONES,JE, POWELL,J, GRAS,J, LILJA,A et al.
Differential protease, innate immunity, and NF-kappaB induction profiles during lung inflammation induced by subchronic cigarette smoke exposure in mice.
Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol 2006 ; 290 :L931-L945.
427. VOLL,RE, HERRMANN,M, ROTH,EA, STACH,C, KALDEN,JR, and GIRKONTAITE,I.
Immunosuppressive effects of apoptotic cells.
Nature 1997 ; 390 :350-351.
428. VRHOVSKI,B and WEISS,AS.
Biochemistry of tropoelastin.
Eur.J.Biochem. 1998 ; 258 :1-18.
429. WACHI,H, SUGITANI,H, MURATA,H, NAKAZAWA,J, MECHAM,RP, and SEYAMA,Y.
Tropoelastin inhibits vascular calcification via 67-kDa elastin binding protein in cultured bovine aortic smooth muscle cells.
J.Atheroscler.Thromb. 2004 ; 11 :159-166.

430. WALTER,MR.
Structural analysis of IL-10 and Type I interferon family members and their complexes with receptor.
Adv.Protein Chem. 2004 ; 68 :171-223.
431. WARE,CF.
The TNF superfamily.
Cytokine Growth Factor Rev. 2003 ; 14 :181-184.
432. WASSEF,M, BAXTER,BT, CHISHOLM,RL, DALMAN,RL, FILLINGER,MF, HEINECKE,J et al.
Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms: a multidisciplinary research program supported by the National Heart, Lung, and Blood Institute.
J.Vasc.Surg. 2001 ; 34 :730-738.
433. WATTS,C.
Immunology. Inside the gearbox of the dendritic cell.
Nature 1997 ; 388 :724-725.
434. WEBB,AC, COLLINS,KL, AURON,PE, EDDY,RL, NAKAI,H, BYERS,MG et al.
Interleukin-1 gene (IL1) assigned to long arm of human chromosome 2.
Lymphokine Res. 1986 ; 5 :77-85.
435. WEBER,KT, SUN,Y, and KATWA,LC.
Local regulation of extracellular matrix structure.
Herz 1995 ; 20 :81-88.
436. WEI,SM, ERDEI,J, FULOP,T, Jr., ROBERT,L, and JACOB,MP.
Elastin peptide concentration in human serum: variation with antibodies and elastin peptides used for the enzyme-linked immunosorbent assay.
J.Immunol.Methods 1993 ; 164 :175-187.
437. WEINER,HL.
Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells.
Microbes.Infect. 2001 ; 3 :947-954.
438. WEISS,JM, RENKL,AC, MAIER,CS, KIMMIG,M, LIAW,L, AHRENS,T et al.
Osteopontin is involved in the initiation of cutaneous contact hypersensitivity by inducing Langerhans and dendritic cell migration to lymph nodes.
J.Exp.Med. 2001 ; 194 :1219-1229.
439. WELLER,A, ISENMANN,S, and VESTWEBER,D.
Cloning of the mouse endothelial selectins. Expression of both E- and P-selectin is inducible by tumor necrosis factor alpha.
J.Biol.Chem. 1992 ; 267 :15176-15183.
440. WOODS,GM, MALLEY,RC, and MULLER,HK.
The skin immune system and the challenge of tumour immunosurveillance.
Eur.J.Dermatol. 2005 ; 15 :63-69.

441. WRENN,DS, HINEK,A, and MECHAM,RP.
Kinetics of receptor-mediated binding of tropoelastin to ligament fibroblasts.
J.Biol.Chem. 1988 ; 263 :2280-2284.
442. WRIDE,MA and SANDERS,EJ.
Potential roles for tumour necrosis factor alpha during embryonic development.
Anat.Embryol.(Berl) 1995 ; 191 :1-10.
443. WRIGHT,SD, RAMOS,RA, TOBIAS,PS, ULEVITCH,RJ, and MATHISON,JC.
CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein.
Science 1990 ; 249 :1431-1433.
444. WU,CY, DEMEURE,C, KINIWA,M, GATELY,M, and DELESPESE,G.
IL-12 induces the production of IFN-gamma by neonatal human CD4 T cells.
J.Immunol. 1993 ; 151 :1938-1949.
445. XING,Z, GAULDIE,J, COX,G, BAUMANN,H, JORDANA,M, LEI,XF et al.
IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses.
J.Clin.Invest 1998 ; 101 :311-320.
446. XIONG,W, ZHAO,Y, PRALL,A, GREINER,TC, and BAXTER,BT.
Key roles of CD4+ T cells and IFN-gamma in the development of abdominal aortic aneurysms in a murine model.
J.Immunol. 2004 ; 172 :2607-2612.
447. YANG,R, YAN,Z, CHEN,F, HANSSON,GK, and KIESSLING,R.
Hyaluronic acid and chondroitin sulphate A rapidly promote differentiation of immature DC with upregulation of costimulatory and antigen-presenting molecules, and enhancement of NF-kappaB and protein kinase activity.
Scand.J.Immunol. 2002 ; 55 :2-13.
448. YAO,J, MACKMAN,N, EDGINGTON,TS, and FAN,ST.
Lipopolysaccharide induction of the tumor necrosis factor-alpha promoter in human monocytic cells. Regulation by Egr-1, c-Jun, and NF-kappaB transcription factors.
J.Biol.Chem. 1997 ; 272 :17795-17801.
449. YEWDELL,JW, NORBURY,CC, and BENNINK,JR.
Mechanisms of exogenous antigen presentation by MHC class I molecules in vitro and in vivo: implications for generating CD8+ T cell responses to infectious agents, tumors, transplants, and vaccines.
Adv.Immunol. 1999 ; 73 :1-77.
450. YOSHIMURA,S, BONDESON,J, FOXWELL,BM, BRENNAN,FM, and FELDMANN,M.
Effective antigen presentation by dendritic cells is NF-kappaB dependent: coordinate regulation of MHC, co-stimulatory molecules and cytokines.
Int.Immunol. 2001 ; 13 :675-683.

451. YSSEL,H, DE WAAL,MR, RONCAROLO,MG, ABRAMS,JS, LAHESMAA,R, SPITS,H et al.
IL-10 is produced by subsets of human CD4+ T cell clones and peripheral blood T cells.
J.Immunol. 1992 ; 149 :2378-2384.
452. YUN,PL, DECARLO,AA, COLLYER,C, and HUNTER,N.
Modulation of an interleukin-12 and gamma interferon synergistic feedback regulatory cycle of T-cell and monocyte cocultures by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide in the absence or presence of cysteine proteinases.
Infect.Immun. 2002 ; 70 :5695-5705.
453. YUSA,T, BLOOD,CH, and ZETTER,BR.
Tumor cell interactions with elastin: implications for pulmonary metastasis.
Am.Rev.Respir.Dis. 1989 ; 140 :1458-1462.
454. ZANDI,E, ROTHWART,DM, DELHASE,M, HAYAKAWA,M, and KARIN,M.
The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation.
Cell 1997 ; 91 :243-252.
455. ZHANG,D, GAUSSIN,V, TAFFET,GE, BELAGULI,NS, YAMADA,M, SCHWARTZ,RJ et al.
TAK1 is activated in the myocardium after pressure overload and is sufficient to provoke heart failure in transgenic mice.
Nat.Med. 2000 ; 6 :556-563.
456. ZHANG,H, APFELROTH,SD, HU,W, DAVIS,EC, SANGUINETI,C, BONADIO,J et al.
Structure and expression of fibrillin-2, a novel microfibrillar component preferentially located in elastic matrices.
J.Cell Biol. 1994 ; 124 :855-863.
457. ZHANG,M and PARKS,WC.
Posttranscriptional regulation of lung elastin expression involves binding of a developmentally regulated cytosolic protein to an open-reading frame cis-element in the messenger RNA.
Chest 1999 ; 116 :74S-
458. ZHANG,S, HAN,J, SELLS,MA, CHERNOFF,J, KNAUS,UG, ULEVITCH,RJ et al.
Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1.
J.Biol.Chem. 1995 ; 270 :23934-23936.
459. ZHANG,X, NIESSNER,A, NAKAJIMA,T, MA-KRUPA,W, KOPECKY,SL, FRYE,RL et al.
Interleukin 12 induces T-cell recruitment into the atherosclerotic plaque.
Circ.Res. 2006 ; 98 :524-531.

460. ZHANG,Y, MCCLUSKEY,K, FUJII,K, and WAHL,L.M.
Differential regulation of monocyte matrix metalloproteinase and TIMP-1 production by TNF-alpha, granulocyte-macrophage CSF, and IL-1 beta through prostaglandin-dependent and -independent mechanisms.
J.Immunol. 1998 ; 161 :3071-3076.
461. ZHANG,Y and ROM,WN.
Regulation of the interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene by mycobacterial components and lipopolysaccharide is mediated by two nuclear factor-IL6 motifs.
Mol.Cell Biol. 1993 ; 13 :3831-3837.
462. ZHOU,LJ and TEDDER,TF.
CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1996 ; 93 :2588-2592.
463. ZHOU,W, ZHANG,F, and AUNE,TM.
Either IL-2 or IL-12 is sufficient to direct Th1 differentiation by nonobese diabetic T cells.
J.Immunol. 2003 ; 170 :735-740.
464. ZIEGLER-HEITBROCK,HW, KAFFERLEIN,E, HAAS,JG, MEYER,N, STROBEL,M, WEBER,C et al.
Gangliosides suppress tumor necrosis factor production in human monocytes.
J.Immunol. 1992 ; 148 :1753-1758.
465. ZINKERNAGEL,RM and HENGARTNER,H.
Regulation of the immune response by antigen.
Science 2001 ; 293 :251-253.
466. ZUNIGA-PFLUCKER,JC, DI,J, and LENARDO,MJ.
Requirement for TNF-alpha and IL-1 alpha in fetal thymocyte commitment and differentiation.
Science 1995 ; 268 :1906-1909.

Régulation des monocytes et des cellules dendritiques par les produits de dégradation de l'élastine chez l'Homme

RESUME

La réponse de l'organisme contre un agent pathogène nécessite la mise en place de nombreuses interactions entre les cellules et leur environnement. La matrice extracellulaire, qui sert de soutien aux tissus, est remodelée lors d'une réponse inflammatoire ce qui permet la migration des cellules de défense de l'organisme vers le site de l'inflammation. Les peptides issus de la dégradation matricielle peuvent influencer les fonctions biologiques des cellules. Dans les pathologies inflammatoires impliquant des tissus riches en fibre élastiques les cellules des réponses inflammatoires et immunitaires, notamment les monocytes et les cellules dendritiques immatures, se retrouvent dans un environnement riche en produits issus de la dégradation de l'élastine.

Notre travail nous a permis de montrer que les peptides d'élastine induisent une diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β et d'IL-6) par les monocytes humains stimulés par le LPS. Les peptides d'élastine bloquent l'activation de la voie de signalisation cytoplasmique NF- κ B/ I κ B- α induite par le LPS. Dans une seconde étude nous avons démontré que les cellules dendritiques dérivées de monocytes humains possèdent le récepteur à l'élastine à leur surface. L'interaction des peptides d'élastine avec leur récepteur a comme conséquence un effet chimio-attractant des peptides vis-à-vis des cellules dendritiques immatures qui s'accompagne de la production de TNF- α et d'IL-12 par ces mêmes cellules. Par ailleurs, les peptides d'élastine inhibent la maturation des cellules dendritiques induite par le LPS et le TNF- α et polarisent les cellules dendritiques vers un profil tolérogénique ce qui conduit à l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires.

L'ensemble de ces résultats suggère que les produits de dégradation de l'élastine participent à la régulation de mécanismes essentiels de la réponse inflammatoire et immunitaire tels que la production de cytokines par les monocytes ainsi que certaines fonctions biologiques des cellules dendritiques.

MOTS CLES

Inflammation, monocytes, cellules dendritiques, élastine, protéines et peptides de signalisation cellulaire

COMPOSITION DU JURY

Rapporteurs	Madame le Docteur Mary OSBORNE-PELLEGRIN (Paris) Monsieur le Professeur Jacques PIETTE (Liège)
Membres du jury	Monsieur le Professeur Moncef GUENOUNOU (Reims) Monsieur le Docteur Frank ANTONICELLI (Reims) Monsieur le Docteur Joël PESTEL (Lille)
Directeur de thèse	Monsieur le Docteur Richard LE NAOUR (Reims)

COORDONNEES DU LABORATOIRE

Laboratoire d'Immuno-Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire (IPCM)
EA 3796 - IFR 53 Biomolécules
UFR Pharmacie - 51 Rue Cognacq-Jay
51095 REIMS Cedex