UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE U.F.R. DE PHARMACIE

ANNEE 2008

THESE

Présentée en vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE ARDENNE

Discipline : Immunologie

Soutenu publiquement le 14 Janvier 2008

Par

Denise AL ALAM

Née le 17 Mars 1982 à Jal El Dib – Liban

IMPACT DE L'INTERACTION ENTRE LES CELLULES EPITHELIALES BRONCHIQUES ET STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUR LE CHIMIOTACTISME DES LYMPHOCYTES T DANS LA MUCOVISCIDOSE

<u>JURY</u>

Président

Rapporteurs

Pr. Moncef GUENOUNOU (Reims)

Pr. Bruno CRESTANI (Paris) Dr. Lhousseine TOUQUI (Paris)

Examinateurs

Dr. Jean-Claude SIRARD (Lille) Pr. Sophie GANGLOFF N^{\bullet}

A la mémoire de mon grand-père « Mansour »,

Grand-père,

Tu as toujours cru en moi, tu étais sur que j'arriverai au bout. Mais la force t'a manqué et tu es parti deux jours avant la fin. Tu n'as pas pu être là pour le grand jour mais je sais que tu y croyais plus que tout le monde. Ton combat m'a donné la force d'aller jusqu'au bout. Tes conseils ont toujours éclairé mon chemin, et je tacherai de ne pas les oublier. A mes grand-parents

Votre soutien et votre amour font ma force. Vous avez toujours veillé sur moi et m'avez toujours conseillé. Merci pour votre amour éternel.

A mes parents,

Sans qui je ne serai pas là aujourd'hui. Tout ce que j'ai accompli dans ma vie, c'est grâce à vous, à votre soutien, votre amour et vos sacrifices. Merci infiniment...

A mon petit frère Tarek, Tu es mon exemple de courage et ma raison de vivre. Tes encouragements incessants me donnent des ailes. Merci beaucoup...

A ma sœur Lina et mon frère Toni pour leur présence et leur soutien.

A mes filleuls, Anthony, Ralph et Elie qui m'ont toujours donné le sourire.

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein de l'équipe d'accueil EA3796 "Laboratoire d'Immunologie et de Microbiologie" dirigée par le **Professeur Moncef Guenounou**. Je vous remercie sincèrement de la confiance que vous m'avez temoignée en m'accueillant dans votre laboratoire. Je vous remercie également pour votre grande disponibilité et votre écoute de tous les moments.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements au **Professeur Bruno Crestani** qui m'a fait l'honneur d'être mon rapporteur de thèse mais aussi pour nos discussions très riches lors de congrès et pour m'avoir aidée dans mes recherches de stage postdoctoral.

Je remercie le **Docteur Lhousseine Touqui** qui m'a fait l'honneur d'être également mon rapporteur de thèse, mais aussi pour l'accueil et la visite guidée à l'Institut Pasteur sans oublier les nombreux congrès qui m'ont permis de profiter de vos connaissances, vos encouragements et vos grandes qualités scientifiques.

Je remercie le **Docteur Jean-Claude Sirard** qui m'a fait l'honneur d'être l'examinateur de ce travail de thèse et de faire partie de mon jury.

Je voudrais remercier le **Professeur Sophie Gangloff** pour m'avoir permis d'intégrer le laboratoire et qui a dirigé ma thèse pendant ces 3 années. Je voudrais lui témoigner toute ma reconnaissance et la remercier pour m'avoir guidée tout au long de ce travail de thèse. Ta rigueur et ton esprit critique m'ont permis de finir à bien ce travail. Sophie, je te remercie d'avoir toujours été là pour moi, dans les moments difficiles. Tu as été une amie et une grande soeur en plus de tout le reste. Je ne manquerai pas de revenir quand l'occasion se présentera pour faire un resto ou voir un film au ciné (promis je ne parlerai pas pendant le film!).

Je remercie particulièrement et très sincèrement l'association Vaincre la Mucoviscidose, son président, son conseil scientifique et tous ses membres qui m'ont soutenue financièrement pendant ces trois ans et qui m'ont permis de participer à différents congrès respiratoires.

J'exprime mes sincères remerciements au **Docteur Edith Puchelle** qui a initié ce projet. Merci pour toutes les discussions scientifiques et pour ses conseils éclairés.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements au **Professeur François Lebargy** et le **service de pneumologie** du CHU de Reims, au **Docteur Christine Rouger** et le **service d'infectiologie** du CHU de Reims, et à tous les patients qui ont participé à l'étude clinique et sans qui cette étude n'aurait jamais vu le jour.

Je remercie également le **Professeur Philippe Nguyen**, **Catherine Macé** et l'ensemble du **service d'Hématologie** du CHU de Reims qui nous ont fourni les lymphocytes après élutriation pour notre première étude.

Je souhaite également exprimer mes sincères remerciements à tous les membres de l'EA3796, anciens et actuels :

A Azzaq Belaaouaj : (je vous compte dans l'équipe, en tout cas c'est tout comme...). Merci de m'avoir recommandée, et de m'avoir permis d'organiser les fêtes dans l'équipe, ça va me manquer !!

A **Richard Le Naour** pour ses conseils en cytométrie en flux, sa rigueur et ses interventions pour me défendre lors des réunions (J'espère que maintenant tu connais mon prénom... euhh.... Denise !).

A **Bouchaib Lamkhioued**, chercheur dans l'âme, pour nos accords et désaccords, ta bonne humeur et tes conseils. Tu es notre meilleur chercheur !

A Gaetan Deslée pour la planification des prélèvements, ta gentillesse et ta disponibilité malgré ton emploi de temps chargé (merci pour les prélèvements du soir qui m'ont fait découvrir le labo by night !).

A Jocelyne Carquin pour tes précieux conseils en microbiologie et ton aide inconditionnée.

A Elisabeth Le Magrex pour les moments partagés en TP.

A **Chantal Grimplet**, notre ange gardien, fini les préparations de milieu de dernière minute et les autoclaves la veille des vacances. Merci pour votre grande gentillesse et votre patience. Ils ont de la chance de vous avoir dans ce labo.

A **Catherine** et **Jennifer** toujours dispos pour répondre à mes questions administratives et avec le sourire SVP.

Claudie Madoulet : « la raleuse ». Jusqu'à preuve du contraire et jusqu'au 1er Janvier 2008, tu fais toujours partie de l'EA3796. Ta bonne humeur et ton soutien, surtout pendant les derniers mois de ma thèse, m'ont beaucoup aidé. Merci.

A **Pascale Koebel** : qui a supporté mes caprices et mes coups de gueule pendant trois ans. Tu étais toujours à l'écoute de mes problèmes et de mes histoires. Ta sympathie, ta gentillesse et

tes grandes qualités scientifiques vont me manquer. Tu étais mon référant technique pendant toutes ces années. Merci de m'avoir fait goûter aux poireaux, maintenant j'aime bien.

A **Valérie Gafa** : la fille du sud perdue à Reims, toujours prête à aller vers les autres. C'est dommage qu'on n'ait pas eu le temps de mieux se connaître. Merci pour tes encouragements, ta présence et tout le réconfort que tu m'as apporté en cette fin de thèse.

A **Claire Tournois** : Fini les repas de midi pendant lesquels on refait le monde... Ton soutien pendant toutes ces années a beaucoup contribué à l'aboutissement de cette thèse. Ton bureau c'est mon confessionnal et toi mon curé et ma cure. Tu as toujours été présente pendant les moments les plus difficiles de ma vie professionnelle et personnelle. Tu m'as trop maternée et gâtée et j'ai eu beaucoup de chance de t'avoir auprès de moi. Merci pour les nuits difficiles où tu m'as hébergée chez toi. Tu es invitée à LA avec William, Thomas et Morgane mais sans le toutou.

A **Christelle Marchiset** : une année d'épanouissement à Reims grâce à ta présence dans ce labo. J'ai beaucoup apprécié les moments passés ensemble, au labo, à la gym et ailleurs. Je te remercie d'avoir été une amie exceptionnelle.

A **Thomas Baranek** : trois ans passés à quelques mètres, ça crée forcement des liens... Je n'oublierai pas ton aide de tous les instants dont j'ai parfois abusé, et les moments partagés au labo et ailleurs. Ta convivialité m'a ravie chaque jour et en plus j'ai eu la chance de connaître ton vrai visage, celui de quelqu'un de sensible et idéaliste. Merci de m'avoir initiée au Poker, même si je n'ai pas été une très bonne élève ! Fini les longues discussions bizarres, va falloir se contenter du mail maintenant !

A tous les postdoctorants, thésards et étudiants de l'équipe : **Jérôme** (pour les efforts ratés d'organisation de sorties, en tout cas personnellement j'ai beaucoup apprécié la bière...), **Damien** (le « parasite » du 3ème étage !! toujours prêt à dresser des tables ! c'est beau la vie d'un parasite entre l'Afrique et l'Islande...), **Hassan** (pour ta bonne humeur et ton sourire, et oui papa je rentre chez moi !), **Abdel** (un peu mystérieux mais très souriant, la preuve ? les photos...), **Rym** (on aurait aimé t'avoir ici, pour voir plus souvent ton sourire et ton calme apaisants), **Sandra** (merci pour les conseils médicaux et bon courage pour la clini-thèse), **Aurélie** (j'espère que tu vas prendre la relève de Thomas dans le labo), **Rachelle** (futur CR, ton défi sera d'organiser le repas de Noël 2008 ! je suis sure que tu peux y arriver...), **Christophe** (tu fais ou pas partie de l'équipe, reste à définir... En tout cas tu es notre DJ attitré !), **Johann** (il faut que tu trouves une autre pleureuse pour tes sorties de cour !! tu seras le prochain !), **Emilie** (j'arrive à finir une thèse, c'est important non ? même si au squash je ne

suis pas une flèche...), **Fred** (Tes blagues vont me manquer, et puis je ne serai plus la pour la bise du matin[®]), **Ludo** (fini les pauses cafés dehors, ça va me manquer...).

Je n'oublie bien sur pas de remercier mes voisins :

Sandie Escotte : qui m'a cédée sa place dans ce bureau, et qui m'as appris à parler avec mes petites cellules. Merci pour tes conseils de tous les moments même quand tu n'étais plus là, et pour avoir lu et corrigé mon manuscrit de thèse en un temps record.

Virginie Sauvage : toujours prête pour se lâcher pendant la pause café (entre 9 et 10) ; tes petites confidences nous faisaient beaucoup rire. Merci pour tes encouragements et ton soutien. Tu m'as ouvert ta porte plus d'une fois, et je t'en remercie. Je te remercie pour ta confiance, ta convivialité et ta gentillesse.

Hélène Marty: c'était très convivial nos repas de midi. Ils m'ont permis de te connaître, une personne souriante et franche. Que veut-on de plus ?

Hamid Morjani : la force tranquille... Je n'ai pas encore oublié ! Tu as promis de servir le Champagne pour ma thèse !!

Patrice Laquerrière : ces deux derniers mois, ton bureau est devenu mon commissariat de proximité où j'allais déposer mes plaintes ! Et tu as su à chaque fois me remotiver. Merci beaucoup.

Aline : Les discussions dans notre bureau étaient un moment de détente, même si souvent tu as été rappelée à l'ordre !

Yves Jacquot : recordman de l'évacuation du bâtiment, ça serait sympa de prévenir les collègues, surtout quand il fait froid !

Gaëlle : « la petite O » (je ne sais pas pourquoi on l'appelle comme ça!) pour les chocolats qu'elle m'offraient tout le temps (c'est bon pour le moral !), mais aussi pour son soutien, son écoute et ses encouragements (même si elle préfère ne pas être là pour ma soutenance O).

Je profite pour remercier tous **mes voisins chimistes au 4ème étage**, non pas pour les bonnes odeurs ☺, mais pour avoir participer à leur façon (chuuuuttt... !) à la réalisation de ma thèse.

Je voudrais également remercier très sincèrement **Mr. Gourdain**, qui partage les douleurs de tous les thésards en phase finale et s'occupe soigneusement de leur manuscrit.

Je tiens à remercier **Mr. Goulouzelle** et toutes les personnes de l'atelier (André, Michel, je ne connais pas les prénoms de tout le monde, désolée), qui ont toujours répondu présents à nos demandes et exigences aussi difficiles qu'elles soient. Je n'oublie pas tout le personnel administratif qui nous facilite la vie au quotidien, et **les informaticiens**, qui, à plusieurs reprises ont sauvé la vie de mon ordinateur.

Je remercie le **Professeur Daniel Courtois** directeur de l'école doctorale, **Docteur Manuel Dauchet** et **Estelle Odinot** pour avoir tout mis en œuvre pour veiller sur les doctorants, les accompagner pendant leur parcours et leur faciliter la vie.

Je tiens à remercier **le Professeur Michel Guichardant** et **le Docteur Nathalie Bernoud-Hubac**, mes encadrants de DEA à Lyon, pour m'avoir initiée à la recherche et m'avoir transmis leur passion pour la recherche.

Merci à tous mes amis qui m'ont soutenu tout le long de cette thèse. Un grand merci à **Karine et Damien** pour leurs encouragements et pour avoir fait le déplacement pour assister à ma soutenance.

Un grand merci à **Sandra Bonnardel** qui a pris le temps de lire ma thèse et de corriger les fautes de français, même si ma thèse est loin d'être passionnante pour toi.

Un immense Merci à **Laurent**, qui avec moi, a refait une thèse. Depuis l'Australie, il a su me motiver, me réconforter et m'inciter à aller de l'avant et ne jamais baisser les bras. Et aujourd'hui, c'est grâce à toi, à ton amour et ton dévouement, que cette thèse aboutit, en dépit de toutes les difficultés. Je ne te remercierai jamais assez.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	4
PUBLICATIONS	4
COMMUNICATIONS ORALES	4
COMMUNICATIONS PAR AFFICHES	5
LISTE DES ABREVIATIONS	7
I ISTES DES FICTIDES ET DES TABI FALLY	10
LISTES DES FIGURES ET DES TADLEAUX	, 10
LISTE DES FIGURES	. 10
LISTE DES TABLEAUX	. 11
PRESENTATION DU TRAVAIL DE THESE	. 12
INTRODUCTION	. 14
APPAREIL RESPIRATOIRE HUMAIN	. 14
I. Structure générale de l'appareil respiratoire	14
I.1. Structure de l'épithélium respiratoire	.15
I.1.1. L'épithélium bronchique	15
I.1.1.1. L'épithélium bronchique de surface	16
I.1.1.1.a. Les cellules ciliées	16
I.1.1.1.b. Les cellules sécrétoires ou caliciformes	17
I.I.I.I.c. Les cellules intermédiaires ou parabasales	18
I.I.I.I.a. Les cellules basales I 1 1 2 I 'énithélium bronchique alandulaire	. 18
1.1.1.2. L'epunetium bionchique gunautaire I 1 1 2 a. Les cellules mugueuses	.17
I.1.1.2.d. Les cellules muqueuses I.1.1.2.b. Les cellules séreuses	20
I.1.1.2.c. Les cellules myoépithéliales	20
I.1.2. L'épithélium bronchiolaire	20
I.1.2.1. Les cellules de Clara	20
I.1.2.2. Les cellules neuro-épithéliales	21
I.1.3. L'épithélium alvéolaire	21
I.1.3.1. Les pneumocytes I	21
I.1.3.2. Les pneumocytes II	22
II. Fonctions de défense de l'épithélium respiratoire	22
II.1. Intégrité de l'épithélium respiratoire	.22
II.2. Défenses mécaniques	.24
II.2.1. Le système mucociliaire	24
II.2.1.1. La clairance mucociliaire	24
II.2.1.2. Le mucus	24
II.2.2. Les agents antimicrobiens	25
II.3. Défenses immunitaires	.28
INFECTIONS PULMONAIRES	. 29
I. Généralités	
II. Infections bactériennes	29
II.1. Généralités	.29
II.2. Infections à S. aureus	.29
II.2.1. Description générale de <i>S. aureus</i>	29

II.2.1.1. La paroi de S. aureus	.30
II.2.1.2. La capsule de S. aureus	.31
II.2.1.3. Les protéines de surface de S. aureus	.32
II.2.1.4. Les protéines sécrétées par S. aureus	.33
II.2.2. Colonisation et transmission de S. aureus	34
II.2.3. Pathogénèse et invasion tissulaire	35
II.2.4. Pouvoir pathogène de S. aureus	36
II.2.5. Sensibilité et résistance aux antibiotiques de <i>S. aureus</i>	37
III. Infections virales	.37
IV. Infections fongiques et parasitaires	.38
INFLAMMATION ET IMMUNITE	39
II. Défense innée	.40
II.1. Reconnaissance des pathogènes	.40
II.1.1. Les TLRs et leurs voies de signalisation	.41
II.1.2. Récepteurs de S. aureus	.43
II.1.2.1. Le TLR2	.44
II.1.2.2. Les protéines Nod	.45
II.1.2.3. Le TNFR1	.45
II.1.2.4. Les PGRPs	.46
II.2. Les chimiokines et leurs récepteurs	.46
II.2.1. Les chimiokines	.46
II.2.2. Les récepteurs des chimiokines	.48
II.2.3. IL-8 ou CXCL8	.49
II.2.4. GROα ou CXCL1	49
11.2.5. IP-10 ou CXCL10	50
II.2.6. MIG ou CXCL9	.50
II.2.7. MCP-1 OU CCL2	
II.2.0. KANTES OU CCL5 II.2.0. Estavina ou CCL11	.51
II.2.7. E0taxine ou CCL11	.52
III I as callulas immunitairas	52
III. Les centres minimuntantes	.34 53
III.1. Les centres phagocytan es	.33 54
III.1.1. Les granulocytes	.34
III.2. Les monocytes et les macrophages	55
III.2. Les cenuies denui diques	.55
III.5. Les tymphocytes	.55
III.3.1. Les « Natur al Killer » III 3.2. Les lymphocytes B	.30
III.3.2. Les lymphocytes D III.3.3. Les lymphocytes T CD3	57
III 3 3 1 Les lymphocytes T CDS	58
III.3.3.2. Les lymphocytes T CD4	.58
III.3.3.3. La polarisation des lymphocytes T.	.58
III.3.3.3.a. La polarisation de Th0 en Th1 et Th2	. 59
III.3.3.3.b. La polarisation de Th0 en Treg	. 60
III.3.3.3.c. La polarisation de Th0 en Th17	. 62
III.3.4. Le chimiotactisme des LT	.63
III.3.5. Les lymphocytes T et l'inflammation pulmonaire	64
LA MUCOVISCIDOSE	67
I. Généralités	.67

II. Historique	68
III. La protéine CFTR	69
III.1. Structure, localisation et fonctions de CFTR	69
III.2. Mutations du gène CFTR	72
IV. Pathologie respiratoire	73
IV.1. Modifications du liquide de surface	73
IV.1.1. Dérégulation des concentrations ioniques : le modèle hypertonique	74
IV.1.2. Dérégulation des mouvements d'eau : le modèle isotonique	75
IV.2. Infections dans la mucoviscidose	75
IV.3. Inflammation pulmonaire dans la mucoviscidose	78
IV.3.1. Les chimiokines	79
1 v.5.2. Les lymphocytes 1 dans la mucoviscidose	00
PARTIE EXPERIMENTALE	. 82
OBJECTIFS	. 83
RESULTATS	. 85
ARTICLE 1	. 86
ARTICLE 2	. 95
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	123
	120

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

PUBLICATIONS

Al Alam D., Deslée G., Tournois C., Lamkhioued B., Lebargy F., Merten M., Belaaouaj A., Guenounou M. and Gangloff SC.

Impaired chemokine secretion and T cell chemotaxis following *Staphylococcus aureus* interaction with cystic fibrosis epithelium (en cours de soumission).

Escotte S., **Al Alam D.**, Le Naour R., Puchelle E., Guenounou M., Gangloff S.C. T cell chemotaxis and chemokine release after *Staphylococcus aureus* interaction with polarized airway epithelium, Am j Respir Cell Mol Biol vol 34. pp 348-354, 2006.

Deslée G., Dury S., Perotin J.M., Al Alam D., Vitry F., Boxio R., Gangloff S.C., Guenounou M., Lebargy F., Belaaouaj A.

Bronchial epithelial spheroids: An alternative culture model to investigate epitheliuminflammation mediated COPD, Respir Res. 2007 Nov 26;8(1):86.

Albers U., Tiaden A., Spirig T., **Al Alam D**., Goyert S., Gangoff S.C., Hilbi H. Expression of *Legionella pneumophila* paralogous lipid A biosynthesis genes under different growth conditions. Microbiology. 2007 Nov;153(Pt11):3817-29.

Helms M., **Al Alam D**., Lam C.W., Getting S.J., Haîkel Y.,Gangloff. S.C., Jessel N. Anti-inflammatory PGA-α-MSH effects on pulp fibroblasts. (Journal of Dental Research, en révision).

COMMUNICATIONS ORALES

<u>Al Alam D</u>., Deslée G., Baranek T., Tournois C., Merten M., Puchelle E., Abély M., Lebargy F., Guenounou M., Gangloff S.C.

Altération de la migration des lymphocytes T et de l'expression de leurs récepteurs aux chimiokines au cours des infections à *S. aureus* dans la mucoviscidose. Journée des jeunes chercheurs IFR53, Juin 2007, Reims, France.

<u>Deslée G</u>, Dury S, Perotin JM, Al Alam D, Vitry F, Boxio R, Gangloff SC, Guenounou M, Lebargy F., Belaaouaj A.

Les sphéroïdes bronchiques: Un modèle de culture cellulaire pour l'étude de la réponse inflammatoire médiée par l'épithélium bronchique dans la Broncho-pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO). Journée des jeunes chercheurs IFR53, Juin 2007, Reims, France.

<u>Al Alam D</u>., Baranek T., Deslée G., Abély M., Puchelle E., Le Naour R., Guenounou M. and Gangloff SC.

Staphylococcus aureus-infected Cystic Fibrosis epithelial cell chemokine secretion and T cell chemotaxis.1st Joint Meeting of European National Societies of Immunology Under the auspices of EFIS, Palais des congrès, september 2006, Paris, France.

<u>Al Alam D</u>., Baranek T., Deslée G., Abély M., Puchelle E., Le Naour R., Guenounou M. and Gangloff S.C.

Staphylococcus aureus-infected cystic fibrosis epithelial cell chemokine secretion and T cell chemotaxis. Euroconferences, Institut Pasteur, june 2006, Paris, France.

<u>Al Alam D</u>., Baranek T., Deslée G., Abély M., Puchelle E., Le Naour R., Guenounou M. et Gangloff S.C.

Sécrétion de chimiokines par des cellules épithéliales CF stimulées par *S. aureus* et chimiotactisme des lymphocytes T CF. 7^e colloque des jeunes chercheurs VLM. Paris. Avril 2006.

COMMUNICATIONS PAR AFFICHES

Al Alam D., Marchiset C., Belaaouaj A., Guenounou M., Gangloff S.C.

Modulation de l'expression de TLR4 et CD14 dans les cellules épithéliales Bronchiques par l'élastase du neutrophile. Journée des jeunes chercheurs IFR, juin 2007, Reims, France.

Al Alam D., Baranek T., Deslée G., Abély M., <u>Puchelle E.</u>, Le Naour R., Guenounou M. and Gangloff SC.

Staphylococcus aureus-infected cystic fibrosis epithelial cell chemokine secretions and T cell chemotaxis. North American Cystic Fibrosis Conference, Colorado Convention Center, November 2006, Denver, Colorado, USA.

<u>Al Alam D</u>., Baranek T., Deslée G., Abély M., Puchelle E., Le Naour R., Guenounou M. and Gangloff SC.

Sécrétion de chimiokines par des cellules épithéliales CF stimulées par *Staphylococcus aureus* et chimiotactisme des lymphocytes T CF. 5^e Congrès Méditerranéen de Pathologie Thoracique, june 2006, Montpellier, France.

<u>Al Alam D</u>., Escotte S., Puchelle E., Guenounou M. and Gangloff S.C. Comparaison des profils de sécrétion des chimiokines par des cellules polarisées CF et non-CF, J2R, Reims, Octobre 2005.

S. Escotte, R. Le Naour, E. Puchelle, **D. Al Alam**, M. Guenounou et <u>S.C. Gangloff.</u> Enhanced T cell Chemotaxis and chemokine release in response to *S. aureus* interaction with polarized airway epithelium. American Thoracic society, june 2005, San Diego, USA.

LISTE DES ABREVIATIONS

Á	Angström
ABC	ATP-binding cassette
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AMPc	Adénosine Monophosphate cyclique
AP-1	Activating Protein 1
ARNm	Acide Ribonucléique messager
ATP	Adénosine Triphosphate
Bbp	Protéine de liaison à la sialoprotéine de l'os
BCR	B Cell Receptor
BPCO	Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive
C	Cystéine
C	Candida
Ca^{2+}	Ion calcium
CD	Cluster of Differentiation
CDs	Cellules Dendritiques
CE CE	Cystic Fibrosis
CETR	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CEU	Colony Forming Unit
CI	Ion chlorure
Clf	Protéine de lisison au fibrinegène
cm	Centimètre
CMH	Complexe Majour d'Histocompatibilité
CMIT	Drotáina da lisison au collegàna
Do	Deltons
Da E coli	Escherichia coli
E. COII	Escherichiu cou Enstein Porr Virus
	Epstein Dall Vilus Drotáine de licison à le metrice extrecelluleire
EDIIAD	Proteine de haison à la matrice extracentulaire
Eops	(E) Chatamata (L) Langing (D) Amining
ELK	(E) Glutamate – (L) Leucine – (R) Arginine
ENaC	Epithelial sodium Channel
FnBP	Proteine de liaison à la fibronectine
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GPCR	G-Protein-Coupled Receptor
GRO-α	Growth Related Oncogene alpha
h +	heure
H'	Ion hydrogène
H. influenzae	Haemophilus influenzae
HBD	Human β -Defensins
HCO ₃	Ion bicarbonate
HLA	Human Leukocyte Antigen
Hsp	Heat shock protein
Hz	Hertz
IFN-γ	Interféron gamma
Ig	Immunoglobuline
IKK	IγB kinase
IL	Interleukine
IP-10	Interferon-gamma Inducible Protein 10
IRAK	IL-1R Associated Kinase
IRF	Interferon Regulatory Factor

Kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
LB	Lymphocyte B
LBA	Lavage Broncho-Alvéolaire
LMP1	Latent membrane protein 1
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocyte T
LTA	Lipoteichoïc Acid
m	Mètre
МАРК	Mitogen Activated Protein Kinase
Mb	Mégabase
MCP	Monocyte Chemoattractant Protein
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MDP	Muramyl Dipentide
mg	Milligramme
MIG	Monokine Induced by Gamma interferon
MID	Macronhage Inflammatory Protein
um	Micromàtre
mm	Millimàtra
mM	Millimolaira
MoCDe	Callulas dandritiques derivées des monocutes
MDD	Multi drug Desistance associated Protein
	Minin ung Resistance associated Floteni Mienobial Surface Components Decognizing Adhesiya Matrix
NISCRAMINI	Malagulas
MD00	Molecules
MyD88	Myeloide Differentiation protein 88
Na	Ion sodium
NaCl	Chlorure de Sodium
NBD	Nucleotide Binding Domain
NEMO	NF-KB Essential Modulator
NF-KB	Nuclear Factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells
NK	Natural Killer
nm	Nanomètre
Nod	Nucleotide-binding oligomerization domain protein
ORCC	Outwardly Rectifying Chloride Channel
OspA	Outer surface protein A
P. aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PGRP	Peptidoglycan Recognition Proteins
pH	Potentiel d'Hydrogène
PK	Protéine Kinase
PNN	Polynucléaire neutrophile
PRRs	Pathogen Recognition Receptors
R	Regulator
RANTES	Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted
RFLP	Restriction Fragment Length Polimorphism
ROMK	Rat Outer Medullary K ⁺ channel
S. aureus	Staphylococcus aureus
S. pneumoniae	Streptococcus pneumoniae
SARM	S. aureus résistant à la méticilline
SDF	Stromal cell-Derived Factor

SLPI	Secretory Leucocyte Proteinase Inhibitor
Spa	Surface protein A
TAK	Transforming growth factor Activated Kinase
TARC	Thymus and Activation-Regulated Chemokine
TCR	T cell receptor
TECK	Thymus Expressed chemokine
TER	Trans-Epithelial Resistance
TGF-β	Transforming Growth Factor bêta
Th	T helper
TIL	Tumor Infiltrating Lymphocytes
TIR	Toll/Interleukin-1 Receptor
TIRAP	Toll/Interleukin-1 Receptor Associated Protein
TLRs	Toll like Receptors
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha
TNFR1	Tumor Necrosis Factor alpha Receptor 1
TRAF	TNFR Associated Factor
TSST-1	Toxic Shoc Syndrome Toxin-1
Ubc	Ubiquitin-conjugating enzyme
ZO	zonula occludens

LISTES DES FIGURES ET DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure générale de l'appareil respiratoire humain14
Figure 2. Les différents types de cellules épithéliales respiratoires de surface selon l'étage
considéré15
Figure 3. Histologie de la muqueuse bronchique16
Figure 4. Cellules ciliées en microscopie électronique (X 3250)17
Figure 5. Cellules de l'épithélium respiratoire en microscopie électronique à transmission . 18
Figure 6. Histologie de l'épithélium bronchique glandulaire
Figure 7. Les jonctions des cellules épithéliales
Figure 8. S. aureus en microscopie optique et en microscopie éléctronique
Figure 9. Structure de S. aureus
Figure 10. Invasion tissulaire de <i>S. aureus</i>
Figure 11. Les différentes voies de signalisation des TLRs
Figure 12. Récepteurs de S. aureus
Figure 13. Familles des chimiokines
Figure 14. Précurseurs des cellules sanguines
Figure 15. Polarisation des lymphocytes T
Figure 16. Polarisation de Th0 en Th1 et Th260
Figure 17. Migration des Treg vers les tissus et organes
Figure 18. Polarisation des Th0 en Th1762
Figure 19. Effets pro-inflammatoires de l'IL-1763
Figure 20. Espérance de vie des patients atteints de la mucoviscidose
Figure 21. Gène cftr et protéine correspondante
Figure 22. Structure de la protéine CFTR70
Figure 23. Action de CFTR sur différents canaux ioniques
Figure 24. Différentes classes de mutation de CFTR73
Figure 25. Modèles hypertoniques et isotoniques de transport d'ions
Figure 26. Prévalence bactérienne en fonction de l'âge76
Figure 27. La diminution d' O_2 dans le mucus favorise l'infection à <i>P. aeruginosa</i> dans la
mucoviscidose

LISTE DES TABLEAUX

Table 1. Agents antimicrobiens sécrétés par les cellules épithéliales	26
Table 2. Présence de peptides antimicrobiens produits par les cellules épithéliales et les	
cellules immunitaires dans les pathologies humaines pulmonaires	27
Table 3. Principales protéines de surface de S. aureus.	32
Table 4. Principales protéines sécrétées par S. aureus.	33
Table 5. Les TLRs, leurs ligands et le type cellulaire dans lequel ils sont exprimés	42
Table 6. Les chimiokines et leurs récepteurs.	48
Table 7. Molécules sécrétées par les polynucléaires neutrophiles	54

PRESENTATION DU TRAVAIL DE THESE

La mucoviscidose (CF) est une maladie autosomale récessive due à une mutation du gène codant pour la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator). Cette maladie affecte principalement les fonctions respiratoires, digestives, génitales et cutanées. Cependant, les manifestations respiratoires, caracterisées par une inflammation respiratoire chronique et des infections bactériennes, représentent 90 % de la morbidité et de la mortalité des patients atteints de la mucoviscidose.

Les premières étapes dans l'infection bactérienne sont l'adhérence bactérienne aux cellules, la multiplication et la dissémination de l'agent pathogène, qui induisent la mise en place des défenses actives de l'hôte. Cette mise en place débute par la sécrétion de médiateurs inflammatoires et est suivi par le développement d'une défense immunitaire innée et acquise. *Staphylococcus aureus (S. aureus)*, commensal de l'épithélium nasal, est un des premiers pathogènes à coloniser l'appareil respiratoire des patients mucoviscidosiques. Cependant, le rôle de *S. aureus* dans la réponse de l'hôte et l'induction de la défense immunitaire dans l'épithélium respiratoire a été encore très peu étudié.

Le but de ce travail de thèse a été d'étudier les conséquences de l'interaction de *S. aureus* avec les cellules épithéliales bronchiques non-CF et CF sur la mise en place de la réponse immunitaire, notamment sur la sécrétion de chimiokines (molécules chimioattractantes des leucocytes) et l'induction du chimiotactisme des lymphocytes T (LT) primaires non-CF et CF. Ce mémoire est articulé autour d'une introduction bibliographique générale, suivie de la partie expérimentale avec la présentation des résultats sous forme d'articles et d'une discussion générale incluant les perspectives.

L'introduction générale porte sur l'appareil respiratoire et son épithélium constitué de différents types cellulaires, sur les infections respiratoires et les défenses immunitaires de l'épithélium respiratoire (inflammation, chimiokines et leurs récepteurs, LT, etc....). Dans la mesure où ce travail porte essentiellement sur la mucoviscidose, la dernière partie de l'introduction sera consacrée aux modifications qui sont associées à cette maladie, aux infections et phénomènes inflammatoires qui l'accompagnent, aux principales chimiokines et leurs récepteurs décrits dans la mucoviscidose pour finir sur la population lymphocytaire.

La partie expérimentale et les résultats présentés sous formes d'articles, décrivent dans un premier temps, l'effet de *S. aureus* sur la sécrétion de chimiokines par les cellules épithéliales bronchiques normales et sur le chimiotactisme des LT primaires de donneurs sains. Nous avons également analysé l'importance des chimiokines et de leurs récepteurs lors de l'infection des cellules épithéliales bronchiques par *S. aureus* et plus particulièrement l'IL-8 (article 1).

Dans un deuxième temps, nous avons comparé la sécrétion de chimiokines par les cellules épithéliales bronchiques non-CF et CF. Nous avons ensuite étudié l'effet de *S. aureus* sur la sécrétion de chimiokines par les cellules épithéliales bronchiques CF et sur le chimiotactisme des LT primaires de patients CF et de donneurs sains. L'effet de l'IL-8 sur le chimiotactisme des LT non-CF et CF ainsi que l'expression différentielle des récepteurs des chimiokines sur les LT CF et non-CF a aussi été entrepris (article 2).

La discussion et les perspectives nous ont permis d'argumenter les résultats obtenus et de décrire les perspectives de ces travaux.

INTRODUCTION

APPAREIL RESPIRATOIRE HUMAIN

I. Structure générale de l'appareil respiratoire

L'appareil respiratoire est un système complexe dont la principale fonction est de conduire l'air extérieur jusqu'aux alvéoles pulmonaires et ainsi permettre les échanges gazeux entre l'air et le sang. Chez les mammifères, le système respiratoire est constitué des voies respiratoires extra-pulmonaires qui regroupent les fosses nasales, le rhino-pharynx, le larynx, la trachée et le début des deux bronches souches, et les voies respiratoires intra-pulmonaires comprenant les bronches, les bronchioles et les alvéoles pulmonaires (Figure 1). Les voies aériennes humaines sont extrêmement ramifiées. A partir de la trachée, l'arbre respiratoire se divise en branches de longueur et de diamètre inégaux, avec des dichotomies irrégulières et asymétriques. La surface totale d'échange du poumon est d'environ 100 à 150 m².



Figure 1. Structure générale de l'appareil respiratoire humain (<u>http://tecfa.unige.ch</u>, 2007).

Depuis les voies proximales (fosses nasales) jusqu'aux voies distales alvéolaires.

I.1. Structure de l'épithélium respiratoire

L'appareil respiratoire humain est recouvert par un épithélium dont l'organisation diffère selon les étages considérés. Les cellules changent également en fonction de l'étage, où elles auront chacune leurs propriétés spécifiques. L'épithélium respiratoire est composé de trois types d'épithélium : l'épithélium bronchique, l'épithélium bronchiolaire et l'épithélium alvéolaire (Figure 2).



Figure 2. Les différents types de cellules épithéliales respiratoires de surface selon l'étage considéré (thèse Sandie Escotte, 2001).

L'épithélium respiratoire de surface est pseudostratifié au niveau de la trachée et des bronches, et composé de 4 types cellulaires (cellules ciliées, caliciformes, intermédiaires et basales). L'épithélium glandulaire est composé de trois types cellulaires (cellules à mucus, cellules séreuses et cellules myoépithéliales (non représentées sur ce schéma)). L'épithélium bronchiolaire est monostratifié et formé de cellules ciliées, de cellules neuroépithéliales et de cellules de Clara. L'épithélium alvéolaire monostratifié est composé de pneumocytes de type I et de pneumocytes de type II.

I.1.1. L'épithélium bronchique

Depuis les fosses nasales jusqu'aux bronchioles, l'épithélium respiratoire comprend un épithélium de surface, en contact avec l'air inhalé, et un épithélium glandulaire, situé dans la sous-muqueuse respiratoire. Ces deux épithéliums sont séparés par la lame basale.

I.1.1.1. L'épithélium bronchique de surface

L'épithélium bronchique de surface est composé de quatre types cellulaires différents : les cellules ciliées, les cellules caliciformes muqueuses, les cellules intermédiaires et les cellules basales (Figure 3).





Les cellules musculaires lisses (1), le tissu conjonctif (2), la lame basale (3), les cellules basales au noyau petit et plus ou moins arrondi (4), les cellules intermédiaires fusiformes ressemblant aux cellules basales (5), les nombreuses cellules caliciformes (6) au mucus à peine teinté et au noyau basal triangulaire, les cellules ciliées au noyau ovalaire (7) et les cils (8).

I.1.1.1.a. Les cellules ciliées

Les cellules ciliées représentent plus de 50 % des cellules de l'épithélium de surface (Spina, 1998). Ce sont des cellules prismatiques au noyau ovalaire situé à la partie basale de la cellule. Elles se caractérisent par la présence, à leur pôle apical, de nombreux cils (environ 300 cils chacune) et de nombreuses microvillosités (Figure 4). Ce pôle apical est également riche en mitochondries qui fournissent l'énergie nécessaire aux battements ciliaires. La densité et la longueur des cils varient selon leur localisation (5-7 μ m dans la trachée et 3-4 μ m dans les bronches) (Greenwood *et al.*, 1972). La fréquence de battements des cils est comprise entre 10 et 15 Hz *ex vivo* (Zahm *et al.*, 1990), et elle est plus élevée dans les bronches proximales que dans les bronches distales (Rutland *et al.*, 1982). Les battements ciliaires assurent la clairance mucociliaire permettant d'éliminer le mucus contenant les aérocontaminants et les micro-organismes qui pénètrent dans les voies respiratoires. Outre leur rôle dans le transport du mucus, les cellules ciliées permettent la sécrétion de macromolécules

et le transport d'eau et d'ions à travers la muqueuse respiratoire (Varsano *et al.*, 1987 ; Nadel *et al.*, 1985).



Figure 4. Cellules ciliées en microscopie électronique (X 3250) (Chilvers et O'Callaghan, 2000).

I.1.1.1.b. Les cellules sécrétoires ou caliciformes

Dans la trachée humaine, le nombre de cellules sécrétoires est estimé en moyenne à 6000-7000 cellules/mm² (Ellefsen *et al.*, 1972). Elles présentent un noyau basal entouré par la plupart des organites cellulaires. En microscopie électronique, elles sont caractérisées par la présence de granules sécrétoires peu denses aux électrons (Figure 5), principalement situés à leur pôle apical et contenant des mucines (Verdugo *et al.*, 1990). Les mucines sont des protéines acides (en raison de la présence d'acide sialique et de groupement sulfate) et fortement glycosylées. Les cellules sécrétoires, la peroxydase, etc... (Goodman *et al.*, 1981; Christensen *et al.*, 1981; Christensen *et al.*, 1982). Ces cellules sont capables de s'autorenouveler et de se différencier en cellules ciliées (Jeffery et Li, 1997). Le nombre de ces cellules augmente dans certaines pathologies respiratoires telles que les bronchites chroniques et la mucoviscidose.



Figure 5. Cellules de l'épithélium respiratoire en microscopie électronique à transmission (Jeffery et Li, 1997).

C: Cellules ciliées. G: Cellules sécrétoires. B: Cellules basales. M: Mastocytes. V: Vaisseau sanguin

I.1.1.1.c. Les cellules intermédiaires ou parabasales

Les cellules intermédiaires sont des cellules fusiformes, ancrées à la lame basale et n'atteignant pas la surface de l'épithélium. En microscopie électronique à transmission, elles ressemblent aux cellules basales mais avec des noyaux plus hauts que ceux de ces dernières (Breeze *et al.*, 1977 ; Mercer *et al.*, 1994). En microscopie optique, les cellules intermédiaires ne présentent pas de caractéristiques ciliées, endocrines ou sécrétoires (Donnelly *et al.*, 1982 ; Breuer *et al.*, 1990).

I.1.1.1.d. Les cellules basales

Les cellules basales sont des cellules de petites tailles, triangulaires. Elles ont un faible rapport nucléo-cytoplasmique. Les cellules basales sont ancrées à la lame basale par des jonctions stables situées à leur pôle basal (les hemidesmosomes), et sont attachées aux autres cellules épithéliales par des desmosomes (Baldwin, 1994). Elles jouent un rôle principal dans la régénération de l'épithélium respiratoire (Ayers et Jeffery, 1988).

I.1.1.2. L'épithélium bronchique glandulaire

L'épithélium respiratoire glandulaire, présent dans la sous-muqueuse bronchique, est situé entre l'épithélium de surface et le cartilage. Il est constitué d'un tissu conjonctif lâche contenant les glandes sécrétoires mixtes, elles-mêmes constituées de trois types cellulaires : les cellules muqueuses, les cellules séreuses et les cellules myoépithéliales (Figure 6).



Figure 6. Histologie de l'épithélium bronchique glandulaire (thèse Delphine Gras, 2006).

1. Glande séro-muqueuse. 2. Cellules glandulaires muqueuses. 3. Cellules glandulaires séreuses. 4. Lumière. 5. Capillaire sanguin.

I.1.1.2.a. Les cellules muqueuses

En microscopie électronique, les cellules muqueuses sont caractérisées par un cytoplasme dense aux électrons. Leur cytoplasme contient de nombreux granules sécrétoires de petites tailles. Ces granules, situés au pôle apical des cellules, sont électron-clairs en microscopie électronique et riches en mucines.

I.1.1.2.b. Les cellules séreuses

Les cellules séreuses sont caractérisées par des granules denses aux électrons (Meyrick et Reid, 1970). Ces granules sont situés dans la partie apicale du cytoplasme. Elles renferment des protéines telles que la transferrine, l'antileucoprotéase, le lysozyme considéré comme marqueur spécifique de l'activité sécrétoire des glandes séreuses, etc... (Bowes *et al.*, 1981 ; Franken *et al.*, 1980 ; Franken *et al.*, 1989). Les cellules séreuses sécrètent également des mucines neutres sulfatées, et des substances non-muqueuses, probablement des lipides (Spicer *et al.*, 1980).

I.1.1.2.c. Les cellules myoépithéliales

Les cellules myoépithéliales de forme allongée sont positionnées à la base de l'épithélium glandulaire en contact avec la lame basale. Elles sont également en contact direct avec les cellules sécrétoires glandulaires trachéo-bronchiques. Elles entourent les glandes, et en se contractant, elles exercent une pression sur ces dernières favorisant ainsi la libération des sécrétions glandulaires vers la lumière des voies aériennes.

I.1.2. L'épithélium bronchiolaire

L'épithélium bronchiolaire se situe vers la périphérie au niveau des bronchioles. Il est dépourvu de cellules caliciformes. Les cellules ciliées sont moins hautes mais présentent la même morphologie et les mêmes propriétés que dans l'épithélium bronchique. Les cellules basales sont beaucoup moins nombreuses. On distingue également les cellules de Clara et les cellules neuro-épithéliales.

I.1.2.1. Les cellules de Clara

Les cellules de Clara ou cellules en dôme présentent un pôle apical faisant saillie dans la lumière bronchiolaire, caractérisé par la présence de quelques microvillosités et de granules sécrétoires denses aux électrons (Singh et Katyal, 1997). Ce sont des cellules bronchiolaires non-ciliées, de forme ovale chez l'Homme et irrégulière chez les autres espèces (Plopper, 1983). La majeure partie du cytoplasme est remplie par des organelles, dont le noyau, qui est le composant le plus volumineux. Leur fonction principale est la production et la sécrétion de nombreuses molécules telles que des glycoprotéines et des lipides, l'antileucoprotéase et les protéines A et B du surfactant alvéolaire (Widdicombe et Pack, 1982 ; De Water *et al.*, 1986). Elles sont également connues pour leur capacité d'échange ionique (Van Scott *et al.*, 1987).

I.1.2.2. Les cellules neuro-épithéliales

Les cellules neuro-épithéliales ou neuro-endocrines se regroupent au niveau bronchiolaire où elles forment des corps neuro-épithéliaux, ou bien elles peuvent être isolées les unes des autres. Elles possèdent de nombreux granules denses et ont une forme triangulaire proche de celle des cellules basales. Elles sont toutes au contact de la lame basale. Néanmoins, elles ont des prolongements cytoplasmiques qui atteignent la lumière des voies respiratoires (Knight et Holgate, 2003 ; Boers *et al.*, 1996). Ces cellules expriment à leur surface une protéine de liaison à l'oxygène qui leur confèrent la fonction de détecteur et de transducteurs de l'hypoxie (Cutz et Jackson, 1999 ; Youngson *et al.*, 1993). Elle ont également un rôle dans la régulation de la croissance et de la régénération de l'épithélium (Reynolds *et al.*, 2000).

I.1.3. L'épithélium alvéolaire

L'épithélium alvéolaire est monostratifié. Les cellules épithéliales alvéolaires sont de deux types : les pneumocytes de type I et les pneumocytes de type II. Les alvéoles sont recouvertes par une fine pellicule constituant le surfactant. Le surfactant joue un rôle important dans la défense immunitaire du poumon en stimulant la phagocytose et la capacité de migration des macrophages alvéolaires (O'Neill *et al.*, 1984 ; Hoffman *et al.*, 1987).

I.1.3.1. Les pneumocytes I

Bien que les pneumocytes I couvrent 95 % de la surface alvéolaire environ (5100 μ m² environ), ils ne représentent que 37 % de la population épithéliale à cause de leur forme allongée. Ils ont un volume moyen de 1800 μ m³ (Crapo *et al.*, 1982) et possèdent peu d'organelles intracellulaires témoignant de leur activité métabolique peu intense (Mercurio et Rhodin, 1976). Ils ont un compartiment cytoplasmique très fin (0,1 à 0,3 μ m d'épaisseur), ce qui explique leur implication dans les échanges gazeux.

I.1.3.2. Les pneumocytes II

Les pneumocytes II occupent 5 % de la surface alvéolaire et constituent 63 % de la population épithéliale, avec un volume moyen de 750 μ m³ environ (Crapo *et al.*, 1982; Fehrenbach *et al.*, 1995). Ce sont des cellules métaboliquement très actives possédant un cytoplasme riche en mitochondries et en réticulum endoplasmique rugueux. La principale fonction des pneumocytes II est la production et la sécrétion intra-alvéolaire du surfactant.

II. Fonctions de défense de l'épithélium respiratoire

L'épithélium de surface trachéo-bronchique, exposé aux agressions extérieures et à de nombreux agents pathogènes, constitue la première ligne de défense de la muqueuse bronchique vis-à-vis de l'environnement. Etant donné la fréquence et la diversité des agents toxiques et infectieux qui entrent en contact avec l'épithélium respiratoire, celui-ci s'est doté d'un système de défense constitué des jonctions intercellulaires, du liquide de surface qui le couvre ainsi que de la réponse immunitaire associée.

II.1. Intégrité de l'épithélium respiratoire

La cohésion de l'épithélium de surface est assurée par la présence de jonctions intercellulaires qui constituent une barrière physique imperméable vis-à-vis des aérocontaminants et des agents pathogènes. Différents types de jonctions cellulaires contribuent à la cohésion et l'intégrité de cette barrière (Figure 7).

Les jonctions serrées, situées au niveau de la partie apicale de la membrane baso-latérale des cellules ciliées, ont pour rôle d'assurer l'imperméabilité de l'épithélium et d'éviter la pénétration des bactéries dans la muqueuse respiratoire, tout en permettant la diffusion de petites molécules chargées et hydrophiles telles que les ions (Madara et Dharmsathaphorn, 1985; Godfrey *et al.*, 1992). Les jonctions serrées sont associées à différentes protéines telles que la *zonula occludens* 1 (ZO-1), l'occludine et les claudines. Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa)* induisent une dégradation de la protéine ZO-1, diminuant ainsi l'intégrité de la barrière épithéliale (Coraux *et al.*, 2004).

Les jonctions intermédiaires forment une ceinture appelée *zonula adherens* située juste endessous des jonctions serrées. Ces jonctions permettent l'adhésion intercellulaire. Elles sont composées de protéines d'adhésion telles que les nectines et les cadhérines. La cadhérine-E constitue la principale protéine de ces jonctions (Yamada et Nelson, 2007).
Les desmosomes, situés le long de la membrane baso-latérale, sous les jonctions adhérentes, forment des complexes jonctionnels liant les cellules ciliées aux cellules basales, et aux cellules ciliées adjacentes (Leube et Rustad, 1991). Les desmosomes sont constitués de desmoplakines et de glycoprotéines transmembranaires formant une plaque cytoplasmique dense. Les plaques intracellulaires de ces complexes jonctionnels sont liées aux protéines intermédiaires de type cytokératine (Garrod *et al.*, 1996).

Les jonctions communicantes sont des canaux qui permettent la communication intercellulaire (Falk, 2000a). Elles sont constituées de molécules transmembranaires, les connexines, et jouent un rôle majeur dans la coordination des activités cellulaires comme le contrôle de la fréquence des battements ciliaires en réponse à certains stimuli (Falk, 2000b).

Les hémidesmosomes sont des complexes multiprotéiques qui permettent l'attachement des cellules épithéliales à la lame basale sous-jacente, et assurent la connexion entre les éléments du cytosquelette et la matrice extracellulaire (Garrod, 1993 ; Green et Jones, 1996). Ils sont présents dans les cellules basales (Nakajima *et al.*, 1998) mais pas dans les cellules ciliées et sécrétoires (Shebani *et al.*, 2005).



(b) Courtesy of L. Orci and A. Pertelet, Freeze-Etch Histology (Heidelberg: Springer-Verlag, 1975.) ©1975 Springer-Verlag ©1999 Addison Wesley Longman, Inc.

Figure 7. Les jonctions des cellules épithéliales (<u>http://fig.cox.miami.edu</u>, 2007). a. Jonctions serrées. b. Desmosomes. c. Jonctions Gap

II.2. Défenses mécaniques

II.2.1. Le système mucociliaire

A l'état normal, le mucus respiratoire forme un tapis continu à la surface de l'épithélium respiratoire et constitue ainsi une première barrière de protection efficace entre l'environnement et la muqueuse des voies aériennes.

II.2.1.1. La clairance mucociliaire

La clairance mucociliaire est considérée comme étant le premier mécanisme de défense innée au niveau des voies aériennes (Knowles et Boucher, 2002). Elle est composée d'un système coordonné de transport d'eau et d'ions, de sécrétions de mucines et d'une activité ciliaire synchronisée (Randell et Boucher, 2006).

L'élimination ou la clairance des particules inhalées est différente suivant l'étage bronchique considéré. Les plus grosses particules (d'un diamètre supérieur à 10 μ m) sont éliminées par la cavité nasale et le nasopharynx. Dans les voies proximales, les particules sont piégées dans le mucus de surface, puis l'ensemble est transporté vers l'oropharynx grâce aux battements ciliaires puis dégluti (Zahm *et al.*, 1990). Les battements ciliaires sont coordonnés entre les cellules adjacentes grâce aux jonctions communicantes. Dans les voies distales, le surfactant facilite la clairance des particules en réduisant la tension de surface.

Les principales molécules intervenant dans l'architecture tridimensionnelle du mucus sont les mucines. Les mucines sont des glycoprotéines de très haut poids moléculaire (> 1 x 10^6 Da) constituées de très longs filaments peptidiques contenant des régions hautement glycosylées (2 à 20 saccharides) insensibles aux protéases, et des régions nues dépourvues de glycanes. Les structures glycaniques sont reconnues par les adhésines bactériennes et interviennent donc dans l'adhérence des bactéries au mucus, l'ensemble est ensuite transporté par le système mucociliaire et éliminé hors des voies respiratoires (Lamblin *et al.*, 1992).

II.2.1.2. Le mucus

A l'état normal chez l'adulte, un film de mucus dont l'épaisseur varie entre 0,5 et 2 μ m recouvre l'épithélium respiratoire de surface depuis les voies aériennes supérieures jusqu'aux bronchioles terminales (King et Rubin, 1999). Ce film constitue, à la surface de la muqueuse

respiratoire, un véritable tapis roulant permettant de piéger en permanence des bactéries et de les entraîner des petites bronches jusqu'au pharynx où elles seront normalement dégluties.

La composition du mucus bronchique est complexe. Il présente deux phases: une phase "sol" périciliaire, très fluide, et une phase "gel", visco-élastique du fait de la présence de mucines. Dans les expectorations bronchiques humaines, le mucus contient 95% d'eau, 2 à 3% de protéines et glycoprotéines, 1% de lipides, 1% de minéraux, d'ADN et d'ions (Cross *et al.*, 1994). Le pH du mucus peut varier de 6,5 à 7,8. Différents facteurs peuvent influencer le pH du mucus, comme la sécrétion d'ions H^+ ou HCO_3^- et la présence d'autres systèmes tampons, incluant les glycoconjugués acides ou les macromolécules basiques, comme le lysozyme (Robinson *et al.*, 1989 ; Widdicombe, 1989).

Le mucus bronchique des voies aériennes est sécrété par les cellules des glandes sousmuqueuses (90%), les cellules caliciformes superficielles (5%) et les cellules de Clara (5%). (King et Rubin, 1999). L'hydratation du mucus permet de contrôler l'efficacité des battements ciliaires des cellules épithéliales. La teneur en eau du mucus, les propriétés physiques de la phase "gel" et l'osmolarité de la phase "sol" sont régulées par les cellules épithéliales de surface, *via* le transport actif d'ions CI⁻ et Na⁺ (absorption de Na⁺ et sécrétion de CI⁻). Dans la mucoviscidose, les anomalies de la protéine transmembranaire CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), qui est un canal CI⁻, entraînent une déshydratation considérable du mucus, source d'infection et d'obstruction bronchique sévère (Cuthbert, 1991).

II.2.2. Les agents antimicrobiens

Si la clairance mucociliaire élimine la plupart des pathogènes et particules inhalées, le mucus quant à lui, comporte de nombreuses substances, sécrétées par les cellules épithéliales, qui possèdent une activité protectrice par rapport aux agents infectieux. Certaines de ces molécules possèdent une activité antimicrobienne directe et agissent comme des antibiotiques endogènes (Bals et Hiemstra, 2004). Ces molécules comprennent des petits peptides antimicrobiens cationiques comme les β -défensines et le LL-37 et des protéines antimicrobiennes plus grandes telles que le lysozyme, la lactoferrine et l'inhibiteur de protéinases leucocytaires (SLPI) (Hiemstra, 2001; Schutte et McCray, 2002). Ces molécules permettent l'inhibition de la croissance des microorganismes inhalés qui seront par la suite phagocytés et éliminés par la clairance mucociliaire. Les caractéristiques structurales des peptides antimicrobiens permettent de les diviser en différentes familles (Table 1). Les

défensines et les cathélicidines représentent les deux principales familles exprimées au niveau respiratoire.

Défensines (α-défensines et β-défensines)	Inhibiteur de protéinases leucocytaires (SLPI)
Cathélicidines (LL-37)	Protéines du surfactant (SP-A et SP-D)
Lysozyme	Peptides anioniques
Phospholipases A2 sécrétées (PLA2)	Protéine de la famille du facteur « Trefoil » (TFF)
Immunoglobulines A (Ig A)	Protéines riches en Proline
Lactoferrine	

 Table 1. Agents antimicrobiens sécrétés par les cellules épithéliales (D'après Devine, 2003).

Chez l'Homme, au niveau pulmonaire, les peptides antimicrobiens sont produits et sécrétés principalement par les cellules épithéliales et les cellules phagocytaires. Certains de ces peptides sont produits constitutivement comme la β -défensine 1 humaine (hBD-1); tandis que d'autres sont surexprimés suite au contact des cellules avec des agents microbiens ou des médiateurs pro-inflammatoires tels que hBD-2, hBD-3, hBD-4 et LL-37 (Harder *et al.*, 2000 ; O'Neil *et al.*, 1999 ; Tsutsumi-Ishii et Nagaoka, 2002 ; Krisanaprakornkit *et al.*, 2002 ; Takahashi *et al.*, 2001 ; Garcia *et al.*, 2001). Des études *in vivo* ont montré que la concentration de certains peptides antimicrobiens comme les β -défensines augmente dans différents fluides biologiques de patients atteints de maladies infectieuses et/ou inflammatoires telles que la pneumonie et la mucoviscidose (Hiratsuka *et al.*, 1998 ; Bals *et al.*, 2001) (Table 2).

Substance	Source	Concentrations élevées dans les pathologies
		pulmonaires (Référence)
α-défensines	Cellules épithéliales	Pneumonie (Ashitani et al., 2001 et 2002)
	Cellules inflammatoires	Mucoviscidose (Soong et al., 1997)
		Bronchite chronique (Panyutich et al., 1995)
		Panbronchiolite (Ashitani et al., 1998)
		Fibrose pulmonaire idiopathique (Mukae et al.,
		2002)
β-défensines (BD)	Cellules épithéliales	Pneumonie (Schaller-Bals et al., 2002)
hBD-1	Monocytes/Macrophages	Mucoviscidose (Singh et al., 1998)
hBD-2	Cellules dendritiques	Panbronchiolite (Hiratsuka et al., 2003)
hBD-3		
hBD-4		
Cathélicidine	Cellules épithéliales	Pneumonie (Schaller-Bals et al., 2002)
LL-37/hCAP-18	Neutrophiles	Sarcoïdose (Agerberth et al., 1999)

Table 2. Présence de peptides antimicrobiens produits par les cellules épithéliales et les cellules immunitaires dans les pathologies humaines pulmonaires.

Les défensines possèdent un large spectre d'activité contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif mais aussi contre les champignons et les virus enveloppés (Koczulla et Bals, 2003). L'activité antimicrobienne de ces dernières est basée sur leurs interactions avec les membranes cibles. En effet, les défensines se fixent sur les membranes cibles puis pénètrent dans la membrane sous l'influence de leur force électromotrice provoquant ainsi la déstabilisation de la membrane bactérienne par la formation de pores (Oppenheim *et al.*, 2003 ; Hoover *et al.*, 2000). Par exemple, *Staphylococcus aureus (S. aureus)*, bactérie à Gram positif, est résistant aux hBD-1 et hBD-2 mais sensible à hBD-3 (Harder *et al.*, 2001). Les défensines agissent en synergie avec d'autres molécules comme le lysozyme et la lactoferrine. Le lysozyme est une enzyme antibactérienne sécrétée en grandes quantités au niveau de l'appareil respiratoire humain (10 à 20 mg de lysozyme sécrétés par jour). Il est essentiellement sécrété par les glandes de la sous-muqueuse de la trachée, l'épithélium de surface et les macrophages alvéolaires (Konstan *et al.*, 1982). Le lysozyme est capable de dégrader les peptidoglycanes des parois bactériennes.

La lactoferrine, appelée aussi transferrine, présente en grandes quantités dans les larmes, les sécrétions vaginales et intestinales, la salive et les sécrétions respiratoires, possède à la fois des propriétés antimicrobiennes et anti-inflammatoires (Rogan *et al.*, 2006). Elle exerce une

activité bactéricide directe, en se liant à la membrane bactérienne altérant ainsi la perméabilité membranaire, et une activité bactéricide indirecte par sa capacité à lier le fer essentiel à la croissance des microorganismes. Des études ont montré une activité bactéricide directe de la transferrine sur des souches cliniques d'*Escherichia coli (E. coli), S. aureus* et *P. aeruginosa* isolées de patients atteints de la mucoviscidose (Travis *et al.*, 1999).

Le SLPI, inhibiteur des sérines-protéases, est produit par les cellules glandulaires de la sousmuqueuse bronchique et par les cellules épithéliales non-ciliées. Sa fonction principale est d'inhiber l'élastase du neutrophile. Le SLPI est sécrété en grandes quantités dans le liquide épithélial de surface principalement sous forme inactive, donc incapable de dégrader l'élastase du neutrophile (Vogelmeier *et al.*, 1991). Le SLPI possède une activité antimicrobienne contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Weldon et Taggart, 2007).

II.3. Défenses immunitaires

D'autres mécanismes de défenses interviennent lors des agressions de l'épithélium respiratoire par des agents infectieux. Ces mécanismes comprennent l'initiation d'un processus inflammatoire et la mise en place de la défense innée. Ces aspects seront developpés dans la partie « inflammation et immunité ».

INFECTIONS PULMONAIRES

I. Généralités

Les infections pulmonaires constituent le tiers des infections respiratoires et sont actuellement, dans les pays dits développés, la 6ème cause de décès et la première d'origine infectieuse. Leur incidence annuelle se situe entre 10 et 15 pour 1000 habitants. Les infections pulmonaires peuvent être d'origine bactérienne, virale et plus rarement parasitaire ou fongique.

II. Infections bactériennes

II.1. Généralités

Plusieurs bactéries ont un tropisme pour l'épithélium respiratoire. *Streptococcus pneumoniae (S. pneumoniae)*, responsable de 30 à 45 % des pneumopathies nécessitant une hospitalisation, est considéré comme le plus meurtrier des agents bactériens. Il est la cause de 500000 à 1,4 millions de décès annuels au monde. *Haemophilus influenzae (H. influenzae)* est un pathogène opportuniste, commensal fréquent des voies aériennes supérieures. Sa prévalence, diversement évaluée, est probablement surestimée (à la 2ème place après *S. pneumoniae*). Les autres pathogènes responsables de pneumopathies sont *P. aeruginosa, Legionella pneumophila, Chlamydia pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae, Coxiella burnetti* (agent de la fièvre Q), diverses entérobactéries (*Klebsiella pneumoniae, E. coli*). *S. aureus* est un pathogène opportuniste, responsable lui aussi d'un certain nombre d'infections pulmonaires (Léophonte, 2001).

II.2. Infections à S. aureus

Les infections à *S. aureus* représentent moins de 5 % des pneumonies communautaires et 15 à 30 % des pneumonies nosocomiales.

II.2.1. Description générale de S. aureus

S. aureus est un membre de la famille des *Micrococcaceae*, qui inclut deux genres : les Microcoques et les Staphylocoques. Le genre *Staphylococcus* regroupe trente six espèces, dont dix huit espèces retrouvées chez l'Homme, parmi lesquelles *S. aureus*. C'est un coccus à



Gram positif qui s'organise en grappe (Figure 8), et se caractérise surtout par la pigmentation « dorée » de ses colonies. *S. aureus* est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus*.

Figure 8. S. aureus en microscopie optique et en microscopie éléctronique. Organisation en grappe de S. aureus vue en microscopie optique après coloration de Gram (X 1000) (A) (<u>http://protocol-online.org</u>, 2007) et en microscopie électronique (X 3025) (B) (<u>http://student.ccbcmd.edu</u>, 2007).

II.2.1.1. La paroi de S. aureus

La structure de la paroi bactérienne de S. aureus est caractéristique des bactéries à Gram positif. C'est une structure rigide et résistante qui entoure le cytoplasme et sa membrane. Sa structure est homogène, son épaisseur varie de 10 à 80 nm, elle est riche en osamines mais pauvre en lipides (1 à 2 %). Cette paroi est principalement constituée de peptidoglycane mais il s'y ajoute d'autres constituants. Le peptidoglycane forme autour de la cellule un filet à mailles plus ou moins serrées qui entoure la bactérie à la manière d'un sac. Il constitue une structure très rigide, c'est un véritable exo-squelette qui est responsable de la forme des bactéries. Ce réseau est composé de chaînes de glycanes reliées entre elles par des chaînons peptidiques. Le peptidoglycane possède une activité « endotoxin-like », il stimule la sécrétion de cytokines par les macrophages, active le complément et l'agrégation plaquettaire. Les acides téichoïques sont quantitativement le deuxième composant (Figure 9). Ce sont des polymères constitués d'unités glycérol-phosphate ou d'unité ribitol-phosphate ou d'unités plus complexes dans lesquelles le glycérol ou le ribitol sont associés à des sucres (glucose, galactose, ...). De plus, ils contiennent souvent de la D-alanine liée au glycérol ou au ribitol (Lowy, 1998). Les acides téchoïques sont associés au réseau de peptidoglycane, ils atteignent la surface externe et constituent des antigènes importants. Les acides lipotéchoïques (LTA), liés par des liaisons covalentes aux lipides de la membrane, traversent le peptidoglycane de

part en part pour émerger à la surface. *S. aureus* est donc capable de coloniser l'hôte grâce aux LTA qui se lient aux cellules épithéliales.



Figure 9. Structure de S. aureus (Lowy, 1998).

A.Les protéines de surface et les protéines sécrétées de S. aureus. La synthèse d'un grand nombre de ces protéines dépend de la phase de croissance. B et C. Coupes de l'enveloppe bactérienne. Plusieurs protéines membranaires possèdent une organisation structurale similaire à celle du Clumping factor, comprenant des segments répétés d'acides aminés (C).

II.2.1.2. La capsule de S. aureus

La plupart des *Staphylocoques* produisent des microcapsules. Parmi les onze types de polysaccharides microcapsulaires identifiés, les types 5 et 8 sont retrouvés dans près de 75 % des infections humaines. La majorité des isolats de *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) produisent des polysaccharides microcapsulaires de type 5. La plupart des souches cliniques de *S. aureus* (90 %) possèdent des polysaccharides capsulaires. *S. aureus* est aussi capable de produire des exopolysaccharides, permettant la formation de biofilms qui confèrent aux bactéries une forme de résistance.

II.2.1.3. Les protéines de surface de S. aureus

Les « Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules » (MSCRAMM) qui sont en majorité ancrées aux peptidoglycanes de la paroi bactérienne, permettent la fixation de *S. aureus* aux molécules de la matrice extracellulaire. On distingue cinq groupes différents de protéines de surface : Spa (protéine A), Cna (protéine de liaison au collagène), FnBP (protéine de liaison à la fibronectine), Clf (protéine de liaison au fibrinogène) et EbpS (protéine de liaison à l'élastine) (Table 3) (Foster et McDevitt, 1994 ; O'Connell *et al.*, 1998).

Abréviation	Nom complet de la protéine	Ligands
Bbp	Protéine de liaison à la sialoprotéine de l'os	Sialoprotéine de l'os
ClfA	Protéine de liaison au fibrinogène - A	Chaîne γ du fibrinogène
		Fibrine
ClfB	Protéine de liaison au fibrinogène - B	Chaînes α et β du fibrinogène
		Cytokératine 10 de type I
Cna	Protéine de liaison au collagène	Collagène
EbhAB	Protéine de liaison à la matrice extracellulaire	Fibronectine
EbpS	Protéine de liaison à l'élastine	Elastine
FnBP-A	Protéine de liaison à la fibronectine A	Fibronectine, fibrinogène
		Elastine
FnBP-B	Protéine de liaison à la fibronectine B	Fibronectine, élastine
Spa	Protéine A	Facteur Von Willebrand, IgG

Table 3. Principales protéines de surface de S. aureus.

La protéine A est la protéine de surface bactérienne la mieux caracterisée. C'est une protéine de 42 kDa, présente dans plus de 90 % des souches cliniques de *S. aureus*. Elle peut être sécrétée ou bien liée au peptidoglycane. Elle est capable de se lier aux immunoglobulines et inhiber ainsi l'opsonisation des bactéries et leur élimination par les macrophages et les polynucléaires neutrophiles.

Les protéines du collagène, constituants majeurs de la matrice extracellulaire, représentent un site de choix pour l'ancrage de *S. aureus* aux tissus. L'attachement au collagène *via* les protéines de liaison au collagène (Cna) est d'ailleurs nécessaire et suffisant pour l'adhérence de *S. aureus* au cartilage *in vitro* (Switalski *et al.*, 1993).

Les protéines de liaison à la fibronectine (FnBP) permettent à *S. aureus* de se lier à la fibronectine avec une très grande affinité et de façon quasiment irréversible. FnBP jouent un rôle important dans l'adhérence et l'internalisation de *S. aureus* dans les cellules épithéliales primaires en culture (Sinha *et al.*, 2000). Il existe deux FnBP : la FnBP-A qui se lie à la fibronectine A et la FnBP-B qui se lie à la fibronectine B.

La protéine de liaison au fibrinogène, ou « clumping factor » (Clf), est un récepteur pour le fibrinogène qui provoque l'agrégation des bactéries en présence de plasma. L'interaction Clf-fibrinogène est régulée par la concentration calcique ; elle est inhibée par des concentrations de Ca²⁺ supérieures à 1 mM. Les Clf induisent l'agrégation plaquettaire via le fibrinogène (Miajlovic *et al.*, 2007). Il existe 2 Clf : ClfA et ClfB codées par deux gènes distincts et reconnaissant deux régions différentes du fibrinogène.

La protéine de liaison à l'élastine de *S. aureus* (EbpS) est une protéine de 25 kDa associée à la surface cellulaire. Contrairement aux autres protéines de surface, EbpS n'est pas ancrée au peptidoglycane, c'est une protéine transmembranaire (Downer *et al.*, 2002). Elle se lie à la région NH₂ terminal libre de l'élastine.

II.2.1.4. Les protéines sécrétées par S. aureus

S. aureus est capable de sécréter, au cours de la phase stationnaire de croissance, des enzymes et des exotoxines, comprenant quatre hémolysines (alpha, bêta, gamma et delta), des nucléases, des protéases, des lipases, une hyaluronidase et une collagénase (Table 4). En plus de ces protéines, certaines souches de *S. aureus* produisent une ou plusieurs exotoxines qui ciblent spécifiquement les molécules d'adhésion cellulaire et le système immunitaire de l'hôte.

Superantigènes	Cytotoxines	Enzymes
Entérotoxines A à E	Hémolysines (α , β , δ et γ)	Protéases
Toxine du syndrome de choc toxique (TSST-1)	Leucocidine de Panton-Valentine	Nucléases
Toxines exfoliatives (ET A, B et D)		Lipases
		Hyaluronidase
		Collagénase

Table 4. Principales protéines sécrétées par S. aureus.

Les cytotoxines comme l'alpha-toxine possèdent une activité membranaire. Elles induisent la formation de pores et des changements pro-inflammatoires dans la cellule animale. Ces

altérations cellulaires peuvent contribuer aux manifestations du syndrome septique (Bhakdi et Tranum-Jensen, 1991 ; Walev *et al.*, 1995).

Les superantigènes, quant à eux, se lient au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II, causant une prolifération importante des lymphocytes T et une production de cytokines (Marrack et kappler, 1990). Les entérotoxines sont responsables de l'empoisonnement alimentaire et du syndrome de choc toxique (Harris *et al.*, 1993). La structure de TSST-1 (toxine du syndrome de choc toxique) est similaire à celle des entérotoxines B et C. Le gène codant la TSST-1 est retrouvé dans 20 % des isolats de *S. aureus*. Les toxines exfoliatives, parmi lesquelles les toxines épidermolytiques A et B, causent l'érythème et la séparation de la peau. La leucocidine de Panton-Valentine est une toxine leucocytolitique, associée épidémiologiquement aux infections cutanées sévères (Cribier *et al.*, 1992).

Les enzymes sécrétées par *S. aureus* détruisent les tissus, et sont capables de faciliter la propagation de l'infection aux tissus voisins. Cependant leur rôle exact dans la pathogénèse de l'infection reste mal défini. La β -lactamase est une enzyme qui inactive la pénicilline. La coagulase, activateur de la prothrombine, convertit le fibrinogène en fibrine. Sa contribution à la virulence de *S. aureus* reste incertaine.

II.2.2. Colonisation et transmission de S. aureus

Les *Staphylocoques* sont des bactéries commensales de la peau et des muqueuses de l'Homme et de l'animal. Cependant, le principal réservoir de ce germe reste l'Homme ; 15 à 40 % des adultes ont un portage nasal persistant de *S. aureus* à une densité de 10^3 à 10^4 CFU/cm² (Heczko *et al.*, 1981), le reste de la population a un portage intermittent. *S. aureus* sensibles et SARM sont tous les deux des colonisateurs persistants (Sanford *et al.*, 1994). Les personnes colonisées par *S. aureus* possèdent un risque élevé d'infections ultérieures. En effet, le taux de colonisation par *S. aureus* est élevé chez les patients présentant un diabète de type 1 (Tuazon *et al.*, 1975), les utilisateurs de drogues par voie intraveineuse (Tuazon et Sheagren, 1974), les patients sous hémodialyse (Yu *et al.*, 1986), les patients chirurgicaux (Kluytmans *et al.*, 1995) et les patients avec un syndrome d'immunodéficience (Weinke *et al.*, 1992). Les patients ayant une déficience quantitative ou qualitative de la fonction leucocytaire possèdent également un risque élevé d'infections par *S. aureus*. Les personnes colonisées avec des souches de *S. aureus* encourent un grand risque de devenir infectées par ces souches.

II.2.3. Pathogénèse et invasion tissulaire

S. aureus possède un arsenal très diversifié de facteurs de virulence (protéines de surface, toxines, etc...) qui contribuent à la pathogénèse de l'infection. Ces facteurs de virulence ont des rôles chevauchants et peuvent agir seuls ou en concertation pour le développement de l'infection. S. aureus se lie aux sites lésés où s'accumulent les plaquettes et les fibrines via les MSCRAMM. Alternativement, il a la capacité d'adhérer aux cellules endothéliales directement via les interactions entre les adhésines et leurs récepteurs, ou en se fixant aux composants de la matrice extracellulaire. Les altérations de la matrice extracellulaire et les modifications du microenvironnement cellulaire modifient la susceptibilité des cellules endothéliales à l'infection. Après phagocytose par les cellules endothéliales, S. aureus sécrète des enzymes protéolytiques qui vont faciliter la diffusion dans les tissus avoisinants et le relargage de S. aureus dans le système vasculaire (Lowy, 1998). Une fois dans les tissus sub-épithéliaux avoisinants, S. aureus provoque une réaction inflammatoire et la formation d'abcès. Après phagocytose, les cellules endothéliales expriment des récepteurs Fc et des molécules d'adhésion, et sécrètent des cytokines telles que l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-8. Suite à la sécrétion de cytokines, les leucocytes adhèrent aux cellules endothéliales et migrent par diapédèse vers le site d'infection. Les modifications de la conformation des cellules endothéliales augmentent la perméabilité vasculaire qui s'accompagne d'une transudation des protéines plasmatiques. Après exposition à S. aureus, les macrophages tissulaires et les monocytes circulants sécrètent de l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8 et le TNF- α . L'activation des macrophages survient après le relargage d'IFN γ par les lymphocytes T (Figure 10).



Figure 10. Invasion tissulaire de S. aureus (Lowy, 1998).

II.2.4. Pouvoir pathogène de S. aureus

Les toxémies staphylococciques et les infections suppuratives sont des syndromes provoqués par *S. aureus*. Les toxémies peuvent être dues soit aux toxines produites *in vivo* (exfoliatines et TSST1), soit aux toxines ingérées (entérotoxines dans les aliments). Les infections suppuratives impliquent la prolifération bactérienne, l'invasion, la destruction des tissus de l'hôte et la réponse inflammatoire locale et systémique. *S. aureus* est responsable d'infections au niveau de la peau, des articulations, des os et des systèmes vasculaire et respiratoire, mais aussi d'infections superficielles cutanées, sous-cutanées et muqueuses telles que les furoncles, l'abcès, les cellulites et les lymphangites. *S. aureus* est également la principale cause de méningites, d'ostéomyélites, d'endocardites infectieuses et d'arthrites septiques.

S. aureus, pathogène majeur impliqué dans les infections respiratoires, est capable d'adhérer aux mucines respiratoires (Shuter *et al.*, 1996). Des études récentes d'interaction entre *S. aureus* et les cellules épithéliales bronchiques ont montré que les bactéries adhèrent aux cellules après 1h d'interaction; les bactéries sont internalisées après 4h, et après 24h la

plupart des cellules présentent une altération de la perméabilité membranaire et rentrent dans un état de nécrose (Da Silva *et al.*, 2004, Moreilhon *et al.*, 2005).

II.2.5. Sensibilité et résistance aux antibiotiques de S. aureus

Le traitement des infections à *S. aureus* repose essentiellement sur l'utilisation d'antibiotiques. Cependant, depuis 1960, on assiste à l'émergence croissante de souches résistantes aux antibiotiques, avec une incidence de souches résistantes à la méthicilline actuellement supérieure à 30 % en France. Ces souches de SARM sont devenues progressivement résistantes à de nombreuses classes d'antibiotiques telles que les macrolides, les aminosides et les fluoroquinolones. Actuellement, plus de 90 % des souches de *S. aureus* sont résistantes à la pénicilline G grâce à la production de pénicillinase d'origine plasmidique. Compte-tenu de la fréquence des infections à *S. aureus*, l'émergence de souches de *S. aureus* multi-résistantes aux antibiotiques constitue un problème préoccupant de santé publique (Lowy, 1998).

III. Infections virales

De nombreux virus peuvent être responsables d'infections respiratoires. L'Orthomyxovirus ou virus Influenzae, le virus Para-Influenzae, le virus respiratoire syncytial, l'adénovirus, le rhinovirus et le coronavirus sont des virus à tropisme essentiellement respiratoire, dont la réplication est limitée aux voies respiratoires. L'entérovirus (echovirus et virus coxsackie), le virus de la rougeole, le virus de la varicelle et du zona (Varicella zoster virus), l'herpès virus simplex, le cytomégalovirus et le virus d'Epstein-Barr (EBV) sont des virus à tropisme respiratoire occasionnel, et sont responsables le plus souvent d'infections généralisées (Léophonte, 2001).

IV. Infections fongiques et parasitaires

Ces maladies infectieuses sont rares et surviennent principalement chez les personnes immunodéprimées. Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus, Aspergillus nidulans, Aspergillus terreus, Aspergillus niger et Aspergillus versicolor sont les principaux responsables de la survenue des aspergilloses pulmonaires invasives ou semi-invasives. *Cryptococcus neoformans*, essentiellement opportuniste, provoque la cryptococcose pulmonaire, une mycose cosmopolite. Les Candida, des levures opportunistes, sont responsables des candidoses pulmonaires. Seule une dizaine d'espèces est potentiellement pathogène chez l'Homme. Par ordre de fréquence décroissante, on retient *C. albicans* (70 %), *C. tropicalis, C. torulopsis glabrata, C. parapsilosis, C. krusei, C. pseudotropicalis.* Les principales parasitoses pulmonaires sont le paludisme, l'amibiase, les schistosomiases, la leishmaniose, la paragonimose ou distomatose et l'hydaditose (Léophonte, 2001).

INFLAMMATION ET IMMUNITE

Outre les défenses mécaniques et physiques vis-à-vis des agents infectieux, la mise en place de la défense immunitaire est un processus primordial pour empêcher la progression d'une infection.

I. Inflammation pulmonaire

L'inflammation est un des processus essentiels de la protection d'un organisme, et constitue un phénomène physiologique déclenché lors d'une agression entraînant une altération voire une destruction tissulaire. L'inflammation se manifeste par une rougeur due à la vasodilatation, un oedème, une sensation de chaleur, une douleur et une impotence fonctionnelle. La fonction première de la réponse inflammatoire est d'éliminer ou d'isoler l'agent agresseur (bactéries, virus, parasites, tissus lésés) du reste de l'organisme et de permettre le plus rapidement possible la réparation tissulaire. La réaction inflammatoire se divise en quatre étapes :

- La phase d'initiation : pendant cette première phase, les cellules inflammatoires les plus proches du site de l'agression sont activées. Elles produisent donc des facteurs chimiotactiques qui vont permettre le recrutement de nouvelles cellules inflammatoires et favoriser leur survie.
- La phase d'amplification : elle correspond au développement de la réponse des premières cellules et à l'accélération de l'infiltration locale d'autres types cellulaires.
- La phase de stabilisation : phase au cours de laquelle l'amplification s'arrête *via* la neutralisation des signaux inflammatoires et l'élimination des débris cellulaires.
- La phase de résolution : c'est la phase de restauration de la matrice extracellulaire et la re-épithélisation de la lame basale permettant la restauration de l'intégrité des tissus endommagés.

Bien que le mécanisme central de ce phénomène physiologique soit sous la dépendance des cellules phagocytaires, d'autres cellules et facteurs interviennent aussi, comme les cellules épithéliales *via* la sécrétion de cytokines et de chimiokines et les cellules immunitaires tels que les lymphocytes. De cette interconnexion entre les différents protagonistes résulte un afflux de cellules phagocytaires qui va permettre l'élimination du pathogène et la mise en place d'une réponse immune spécifique.

II. Défense innée

Il est de plus en plus évident que les cellules épithéliales respiratoires ne constituent pas uniquement une barrière passive mais participent activement dans le mécanisme de l'immunité innée (Diamond *et al.*, 2000 ; Holgate *et al.*, 2000). Ces cellules jouent un rôle majeur dans de nombreuses pathologies humaines telles que les infections respiratoires et la mucoviscidose. Elles détectent les infections bactériennes et permettent la mise en place d'une réponse immunitaire caractérisée par la production de molécules antibactériennes, des cytokines et des chimiokines permettant l'initiation d'une réponse inflammatoire. En absence de toute défense, des colonisations bactériennes et des infections conséquentes peuvent survenir. Ainsi la reconnaissance du pathogène et la mise en place d'une réponse immune sont essentiels pour la lutte contre les pathogènes.

II.1. Reconnaissance des pathogènes

La reconnaissance des pathogènes tels que S. aureus par les cellules épithéliales respiratoires représente la première ligne de l'immunité innée. Cette reconnaissance est médiée par des récepteurs, les « pattern-recognition receptors » ou PRRs. Les PRRs peuvent être extracellulaires, membranaires ou cytoplasmiques (Lee et Kim, 2007). Parmi les PRRs les plus connus, on distingue les PRRs extracellulaires tels que le complément, les collectines et les pentraxines qui ont pour rôle l'activation du complément et l'opsonisation du pathogène (Garlanda et al., 2005; Gasque, 2004). Les PRRs membranaires comme le « Mannose Receptor », les intégrines et les « scavenger receptors » permettent l'induction de la phagocytose et les « Toll Like Receptor » (TLR4, TLR2, TLR6 etc...) permettent l'initiation des voies de signalisation intracellulaire (Brown, 2006; Underhill et Ozinsky, 2002). Enfin, les PRRs intracellulaires tels que le TLR3, le TLR7, le TLR9 et les « Nucleotide-binding oligomerization domain proteins » (Nod) jouent un rôle dans la défense intracellulaire antivirale et antimicrobienne. Les PRRs sont capables de reconnaître des motifs moléculaires hautement conservés et associés très souvent à des agents pathogènes les « Pathogen-Assocciated Molecular Patterns » ou PAMPs. Les PAMPs bactériens sont le plus souvent des composants de la paroi cellulaire comme le lipopolysaccharide (LPS), le peptidoglycane et le LTA (Medzhitov, 2007). Les TLRs constituent la famille de PRRs la mieux caractérisée.

II.1.1. Les TLRs et leurs voies de signalisation

Les TLRs sont impliqués à la fois dans les réponses immunitaires innée et adaptative. La famille des gènes des TLRs et leurs voies de signalisation sont très conservées chez les vertébrés et les invertébrés. A ce jour, onze TLRs ont été identifiés chez l'Homme TLR 1 à 11. Ils sont exprimés dans plusieurs types cellulaires dont les cellules épithéliales respiratoires et reconnaissent différents PAMPs (Table 5) (Akira *et al.*, 2006, Gay et Gangloff, 2007). TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10 et TLR11 sont localisés à la membrane plasmique des cellules (Trinchieri et Sher, 2007), ce sont des récepteurs transmembranaires de type I caractérisés par un domaine extracellulaire comprenant des motifs riches en leucine responsable de la reconnaissance du ligand, et un domaine intracellulaire identique à celui du récepteur de l'IL-1 (Toll/IL-1R domain = TIR domain) qui permet l'initiation des voies de signalisation intracellulaire (Akira et Takeda, 2004). Alors que TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont intracellulaires.

TLR	Ligands	Expression
TLR1/2	Triacyl lipopeptides (bactéries et mycobactéries)	Cellules épithéliales
	Facteurs solubles, Porine PorB (Neisseria meningitides)	Cellules dendritiques
	OspA (Borrelia burgdorferi)	Lymphocytes B
		Neutrophiles
TLR2	Lipoprotéines/lipopeptides/Diacyl lipopeptides synthétiques	Cellules épithéliales
	Peptidoglycane et LTA (bactéries Gram+)	Cellules dendritiques
	Lipoarabinomannane,	Cellules endothéliales
	LPS atypique (Leptospira interrogans, Porphyromonas	Monocytes
	gingivalis)	Macrophages
	Glyco-inositolphospholipides, glycolipides, Hsp70,	Neutrophiles
	Hyaluronane	
TLR3	ARN double brin Poly (I-C)	Cellules épithéliales
		Cellules dendritiques
TLR4	Lipopolysaccharide (bactéries Gram-), Taxol (plantes)	Cellules épithéliales
	Fibrinogène, Hsp60 (Chlamydia pneumoniae)	Cellules dendritiques
	Proteine de fusion du virus respiratoire syncytial	Cellules endothéliales
	Flavolipine (<i>Flavobacterium meningosepticum</i>)	Lymphocytes B
	Oligosaccharides de l'acide hyaluronique	Monocytes
	Fragments polysaccharidiques de l'héparane sulfate	Macrophages
TIDE		Neutrophiles
TLK5	Flagelline bacterienne	Cellules dendritiques
		Epithelium intestinal
		Monocytes
		Neutrophiles
TLR6/2	Diacyl lipopeptides des mycoplasmes	Cellules epitheliales
	Lymosan (Saccharomyces cerevisiae)	Neutrophiles
TI D7	LTA (<i>Streptococcus</i> Groupe B)	Called a 4244 (1) also
ILK/	Imidazoquinolones (composes synthetiques)	Cellules den dritigues
	Analogues de la guenosino	Equipophilos
	Analogues de la guanosme	Noutrophilos
TIDQ	AKN du virus <i>influenzae</i>	Collulos épithéliolos
ILKO	A DN du virue Influenzae	Cellules dendritiques
	ARN du vitus <i>injuenzae</i>	Neutrophiles
TIPO	Motife CnG non méthylée ADN	Cellules épithéliales
ILK7	Mours CpO non metryles, ADN	Cellules dendritiques
		L ymphocytes B
		Macrophages
		Neutrophiles
TLR10	Ligand non identifié	Cellules épithéliales
LICIU		Lymphocytes R
		Neutrophiles
TLR11	Profiline de Toxoplasma gondii	Macrophges
	Bactéries uropathogéniques	Cellules épithéliales
	······································	(rein. foie et vessie)

Table 5. Les TLRs, leurs ligands et le type cellulaire dans lequel ils sont exprimés.

Après stimulation, tous les TLRs, sauf TLR3, interagissent avec les protéines adaptatrices MyD88, IRAK et TRAF6 pour activer la voie de signalisation Ubc13/TAK1. Le complexe TAK1 active ensuite le complexe IKK composé de IKK α , IKK β et IKK γ /NEMO

qui catalyse la phosphorylation des protéines I κ B (Figure 11). Les protéines I κ B phosphorylées vont ensuite être dégradées permettant la translocation nucléaire de NF- κ B. TAK1 peut aussi activer la voie des MAPK qui active à son tour AP-1. La protéine IRF5 peut être recrutée par le complexe MyD88-IRAK4-TRAF6, phosphorylée puis transloquée vers le noyau. NF- κ B, AP-1 et IRF5 contrôlent l'expression des gènes codant pour des cytokines et des chimiokines inflammatoires (Kawai et Akira, 2007). La production de cytokines et chimiokines induit une réponse inflammatoire et peut ainsi influencer la mise en place d'une réponse immune adaptative.



Figure 11. Les différentes voies de signalisation des TLRs (Kawai et Akira, 2007).

II.1.2. Récepteurs de S. aureus

Les infections par *S. aureus* résultent de la capacité de ce pathogène à adhérer aux cellules et à échapper ainsi aux défenses de l'hôte. Cependant, la reconnaissance de *S. aureus* par la cellule hôte se fait par le biais de différents récepteurs, en fonction des différents composants de la bactérie. Cette reconnaissance va permettre l'initiation d'une séquence d'événements qui vont conduire à la production et à la sécrétion de nombreuses chimiokines et cytokines inflammatoires, à l'activation de macrophages et monocytes et à l'initiation de

l'immunité adaptative (Schnare *et al.*, 2001). Parmi les récepteurs de *S. aureus*, on distingue le TLR2, les protéines Nod, le « TNF receptor 1 » ou TNFR1 et les protéines de reconnaissance du peptidoglycane ou PGRPs (Figure 12).



Figure 12. Récepteurs de S. aureus (D'après Fournier et Philpott., 2005).

Les protéines de surface et facteurs de virulence de S. aureus interagissent avec différents récepteurs des cellules épithéliales ou endothéliales, des monocytes, macrophages, neutrophiles ou lymphocytes. Ces interactions entraînent une activation de la voie de signalisation NF- κ B d'où la sécrétion de cytokines qui vont moduler le comportement cellulaire et induire une inflammation.

II.1.2.1. Le TLR2

Le TLR2 est le récepteur majoritairement impliqué dans la reconnaissance de *S. aureus*. Il reconnaît essentiellement le LTA et le peptidoglycane de *S. aureus* (Yoshimura *et al.*, 1999). L'absence de TLR2 semble augmenter la susceptibilité de l'hôte à l'infection par *S. aureus*. Il a été montré que les souris TLR2 déficientes sont très susceptibles à *S. aureus* (Takeuchi *et al.*, 2000). Cependant, dans certains modèles d'infection, TLR2 pourrait jouer un rôle plutôt protecteur, comme dans les cas de dysfonctionnement cardiaque provoquée par *S. aureus* (Knuefermann *et al.*, 2004). Comme précédemment décrit, les voies de signalisation de TLR2 sont médiées par MyD88 et TIRAP qui régulent la voie de signalisation NF- κ B. La reconnaissance du LTA par le TLR2 induit la sécrétion de cytokines et de chimiokines telles que TNF- α , IL-10, MCP-1 et IL-8 (Seo *et al.*, 2007; Durand *et al.*, 2006), et provoque chez la souris une infiltration massive de neutrophiles et de macrophages au niveau du site d'infection (Von Aulock *et al.*, 2003).

II.1.2.2. Les protéines Nod

Les protéines Nod pour « Nucleotide-binding Oligomerization Domain protein » jouent un rôle dans l'immunité innée en régulant l'induction de cytokines initiée par des ligands bactériens *via* une activation de NF- κ B indépendamment de la voie de signalisation des TLRs. Ces protéines ont une localisation cytoplasmique et sont au nombre de deux (Nod1 et Nod2). Nod1, exprimée de façon ubiquitaire, reconnaît principalement un fragment du peptidoglycane des bactéries Gram négatives (Girardin *et al.*, 2003a) ; alors que Nod2 se lie au motif MDP (Muramyl Dipeptide), motif commun aux peptidoglycanes des bactéries à Gram négatif. MDP induit la production de TNF- α indépendamment du CD14 et du TLR2 *via* la voie Nod2 (Vidal *et al.*, 2001). Or, le relargage de MDP par *S. aureus* est une étape déterminante pour sa reconnaissance par Nod2. En effet, le MDP peut activer Nod2, principalement exprimée dans les monocytes et les macrophages, après son internalisation dans les cellules phagocytaires (Girardin *et al.*, 2003b).

Nod1 est présente dans de nombreux tissus tels que les poumons. Nod1 peut être activée dans de nombreux types de cellules épithéliales comme les cellules du tractus oro-pharyngé, du colon, de l'œsophage et du cerveau, mais aussi dans les monocytes. Cependant, Nod1 et Nod2 restent très peu étudiées dans les cellules épithéliales respiratoires humaines (Inohara *et al.*, 1999 ; Uehara *et al.*, 2006).

II.1.2.3. Le TNFR1

Comme son nom l'indique, TNFR1 est un récepteur de TNF- α . Il est largement exprimé par les cellules épithéliales. Il est également considéré comme récepteur de la protéine A de *S. aureus*. Dans les monocytes et les fibroblastes, la protéine A interagit avec TNFR1 et induit la sécrétion d'IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IFN- γ et TNF- α (Tufano *et al.*, 1991 ; Perfetto *et al.*, 2003). Les souches de *S. aureus* déficientes pour la protéine A provoquent une mortalité plus faible chez les souris que les souches normales (Palmqvist *et al.*, 2002). En se fixant sur le TNFR1, la protéine A et le TNF- α activent la même voie de signalisation à savoir la mobilisation et le clivage de TNFR1 dans le compartiment extracellulaire ainsi que la production d'IL-8 et le recrutement des neutrophiles *via* l'activation de NF- κ B (Gomez *et al.*, 2004).

II.1.2.4. Les PGRPs

Les « Peptidoglycan Recognition Proteins » (PGRPs) sont des protéines qui possèdent une forte affinité pour le peptidoglycane d'où leur nom. Elles sont impliquées dans la résistance aux bactéries (Michel *et al.*, 2001). Ces protéines, très conservées des insectes aux mammifères, ont été isolées pour la première fois chez *Drosophila melanogaster*. On distingue 4 types de PGRP : PGRP-S, PGRP-L, PGRP-Ia et PGRP-Iβ contenant chacune au moins trois domaines conservés de liaison au peptidoglycane (Girardin et Philpott, 2004). PGRP-S, la protéine la plus étudiée, est observée dans les granules des neutrophiles où elle diminue la croissance des bactéries à Gram positif de faible virulence et induit leur mort intracellulaire. La PGRP-S n'agit pas sur *S. aureus*.

PGRP-L ressemble à l'amidase sérique en terme de poids moléculaire et de spécificité pour le ligand et possède une activité enzymatique. Elle peut être sérique comme les amidases mais elle peut également être membranaire (Liu *et al.*, 2001). PGRP-L dégrade le peptidoglycane et inhibe son activité pro-inflammatoire. Elle joue un rôle mineur dans la réponse immunitaire contre *S. aureus* (Xu *et al.*, 2004).

PGRP-I α et PGRP-I β sont surtout exprimées dans les cellules épithéliales malpighiennes de l'œsophage ; les mécanismes de leur activité anti-microbienne sont mal connus.

II.2. Les chimiokines et leurs récepteurs

II.2.1. Les chimiokines

Les chimiokines constituent un groupe de petites protéines sécrétées de 8 à 12 kDa, qui sont capables d'induire le chimiotactisme de nombreuses cellules telles que les neutrophiles, les monocytes, les lymphocytes, les éosinophiles, les fibroblastes et les kératinocytes. Ces molécules interagissent avec des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à la protéine G. Les chimiokines sont caractérisées par la présence de quatre cystéines en positions hautement conservées (Figure 13). La position NH₂ terminale des résidus cystéines permet de classer les chimiokines et leurs récepteurs en 4 familles : CXC, CC, C et CX3C.

Les chimiokines de la famille CXC sont caractérisées par la présence d'un acide aminé entre les 2 cystéines. Celles de la famille CC sont caractérisées par l'absence d'acides aminés entre les 2 cystéines. Les familles CXC et CC constituent les 2 grandes familles de chimiokines. La famille C quant à elle, possède une seule cystéine et comporte 2 membres, la lymphotactine et



la SCM1β. Enfin, la famille CX3C est caractérisée par la présence de 3 acides aminés entre les cystéines et est composée d'un seul membre, la fractalkine (Mackay, 1997).

Figure 13. Familles des chimiokines (Rollins, 1997).

Les chimiokines sont groupées en 4 familles : CXC, CC, C et CX3C, en fonction de leurs caractéristiques génétiques et structurales (C : cystéine). Toutes les chimiokines possèdent 3 feuillets β et une hélice alpha COOH terminale. La plupart des chimiokines présentent également 4 cystéines en positions hautement conservées.

Les chimiokines des différentes familles possèdent des structures monomériques très semblables qui comprennent une boucle NH₂ terminale, 3 feuillets β anti-parallèles connectés par des boucles et une extrémité COOH terminale en hélice alpha (Figure 13) (Clore *et al.*, 1990; Baldwin *et al.*, 1991). La présence ou l'absence d'un motif de 3 acides aminés (Glu-Leu-Arg) en amont du premier résidu cystéine NH₂ terminale permet de diviser les chiomiokines CXC en 2 types : ELR⁺ et ELR⁻ (Hebert *et al.*, 1991). La présence de ce motif confère aux chimiokines une fonction angiogénique, tandis que son absence engendre des propriétés angiostatiques.

En général, les chimiokines attirent différents leucocytes. Les chimiokines CC attirent principalement les cellules mononucléaires, les éosinophiles et les basophiles. Les CXC ELR⁺

attirent les neutrophiles, et les ELR⁻ attirent les lymphocytes. La lymphotactine attire les lymphocytes T et les chimiokines CX3C attirent les lymphocytes T, les « Natural Killers » ou NK et les monocytes.

Les chimiokines et leurs récepteurs possèdent plusieurs fonctions biologiques. Ils jouent un rôle dans l'inflammation, l'angiogénèse, le développement des organes lymphoïdes, le trafic et le recrutement cellulaire etc... (Rossi et Zlotnik, 2000). A ce jour, près de 50 chimiokines et 18 récepteurs ont été découverts (Table 6).

Old name	New name	Receptor		Main target
IL-8	CXCL8		ê	Neutrophils
GCP2	CXCL6	> CXCR1 —		(isotiskiin)
NAP2	CXCL7			
ENA-78	CXCL5 -	CXCR2 -	•	
GROa	CXCL1	1		
GROB	CXCL2			10000000
GROY	CXCL3		9	= B cells
PF4	CXCL4			
IP10	CXCL10	> CXCR3B		
MIG	CXCL9	\leq CXCR3A —	1 1 1	Louis Product
ITAC	CXCL11			- immature
SDF10/B	CXCL12	- CXCR4 -	* * * * * * * * * * * * *	myetoid DCs
BCA1	CXCL13	- CXCR5 -		= Mature
and the second s	CXCL16	CXCR6		myeloid DCs
BRAK	CXCL14	- Unknown		 Plasmacytoid
MCP1	CCL2			DCs
MCP4	CCL13	Secon		 Monocytes
MCP3	CCL7 t	CCR2 -		
MCP2	CCL8			
MIP1B	CCTA THE	×		
MIPLOS	CCLI TH	⇒CCR5 —		
MIP1 aP	CCLIELI CAP	6		Sector And Grand
RANTES	CCLS ()	A 🧃		Eosinophils
MPIE-1	CCL23	A CLARKER COM		
HCC-1	CCL14	FCCRI -		
HCC-2	CCLIS X	Ω		TRANSFER AND A
HCC-4	CCLI6	Jerna		Basophils
cotaxii	count	PLCKS -		
Cotaxin-2	CCL14			
TARC	CCL20			Naha Teells
MOC		> CCR4 $-$		Memory Tcelle
MIP3	CCL22	CCRS		T 1 cells
FIC	CCL10	- CCNU		T.2 cells
SIC	CCL21	> CCR7 -		
1-309	CC11	CCR8		1 Reg Cells
TECK	CC125	- CCR9 -		
CTACK	CC127	CCDIA		XHC H
MEC	CC128	> CCK10 -	-• +	TWK Cells
PARC	CCI 18			
Lymphotactin	XCI1 -			
SCM1B	XCL2	> XCR1 —	1	
Fractalkine	CX.CL1	CX.CR1		
THE REPORT OF THE PARTY OF THE	and a set			

Table 6. Les chimiokines et leurs récepteurs (Mantovani et al., 2006).

L'ancienne et la nouvelle nomenclature des chimiokines, leurs récepteurs et l'expression de ces récepteurs sur les leucocytes. Les chimiokines peuvent être pro-inflammatoires (rose), homéostatiques (vert) ou les deux à la fois (jaune).

II.2.2. Les récepteurs des chimiokines

Les récepteurs des chimiokines appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés à la protéine G, GPCRs (G-protein-coupled receptors). Ils possèdent une chaîne polypeptidique unique avec trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires, un domaine NH_2 terminal impliqué dans la fixation du ligand et un domaine COOH terminal riche en Sérine/thréonine. La partie externe du récepteur contribue à la reconnaissance de la spécificité du ligand, alors que les parties transmembranaires et intracellulaires sont responsables de la signalisation et l'internalisation (Mantovani *et al.*, 2006). Les récepteurs des chimiokines sont essentiellement exprimés sur les leucocytes (Table 6). L'interaction chimiokine/récepteur de chimiokine entraîne une migration des leucocytes, jouant ainsi un rôle important dans les réactions inflammatoires et la mise en place d'une réponse immunitaire.

II.2.3. IL-8 ou CXCL8

L'IL-8, découverte en 1987, est une chimiokine pro-inflammatoire de la famille CXC ELR⁺. Pour déclencher son activité biologique, la cellule cible doit posséder les récepteurs de l'IL-8 permettant à cette dernière de se fixer et d'activer la cascade intracytoplasmique. Les récepteurs de l'IL-8 sont au nombre de 2 : CXCR1 ou IL-8 RA et CXCR2 ou IL-8 RB dont l'expression varie selon le type cellulaire concerné (Tsai *et al.*, 2000). Les stimuli induisant la production de l'IL-8 sont nombreux. Une augmentation de la sécrétion de l'IL-8 par les cellules épithéliales est observée suite aux infections par des bactéries à Gram positif comme *S. aureus*, des bactéries à Gram négatif comme *P. aeruginosa* et des virus comme le rhinovirus (Larsson *et al.*, 1999 ; Massion *et al.*, 1994 ; Schroth *et al.*, 1999). Une production importante d'IL-8 est aussi observée chez les patients atteints de pneumonies ou de la mucoviscidose (Boutten *et al.*, 1996 ; Tabary *et al.*, 1998). Les activités de l'IL-8 sont variées et la chimioattraction induite par l'IL-8 a été observée sur de nombreuses cellules circulantes : les neutrophiles, les basophiles, les éosinophiles et les lymphocytes (Baggiolini, 2001).

II.2.4. GROa ou CXCL1

GRO α ou "growth-related oncogene alpha", est une autre chimiokine proinflammatoire de la famille CXC ELR⁺. GRO α a été initialement décrite comme chimioattractante pour les neutrophiles mais cette fonction chimioattractante peut s'étendre à d'autres leucocytes. Elle a un récepteur en commun avec l'IL-8 : le CXCR2. GRO α possède les mêmes propriétés sécrétoires et chimioattractantes que l'IL-8. Des quantités importantes de GRO α sont retrouvées dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA) de patients atteints de pneumonies ou présentant le syndrome de détresse respiratoire (Villard *et al.*, 1995). Les facteurs de virulence soluble de *S. aureus* induisent une production importante de GROα et d'IL-8 par les cellules épithéliales bronchiques humaines (Moreilhon *et al.*, 2005).

II.2.5. IP-10 ou CXCL10

L'IP-10 pour « Interferon-gamma Inducible Protein-10 » est une chimiokine proinflammatoire de la famille CXC ELR⁻. Elle est connue pour être produite par les monocytes, les lymphocytes, les kératinocytes, les cellules endothéliales et les neutrophiles en réponse à différents stimuli dont l'interféron (Cassatella, 1996). Cette protéine présente 30 % d'homologie avec l'IL-8. L'IP-10 est un facteur chimioattractant pour les monocytes et les lymphocytes T. L'IP-10 est sécrétée également par les cellules épithéliales respiratoires. CXCR3 est le récepteur de l'IP-10. Suite aux infections par le rhinovirus, les cellules épithéliales respiratoires humaines produisent des quantités importantes d'IP-10, *in vitro* et *in vivo* (Spurrell *et al.*, 2005).

II.2.6. MIG ou CXCL9

MIG ou "monokine induced by gamma-interferon", est une autre chimiokine proinflammatoire de la famille CXC ELR⁻. C'est une protéine isolée des macrophages. Elle possède une activité chimioattractante *in vitro* pour les TIL (tumor-infiltrating lymphocytes) et pour les leucocytes activés par la phytohémaglutinine. MIG et IP-10 partagent un même récepteur, le CXCR3. La sécrétion de MIG par les cellules épithéliales bronchiques peut être induite par l'IFN- γ (Sauty *et al.*, 1999). Les patients souffrant d'une hépatite C chronique présentent des taux élevés de MIG et d'IP-10 au niveau intrahépatique (Zeremski *et al.*, 2007). Des études récentes ont montré que la protéine M1 de *Streptococcus pyogenes* induit une augmentation de la sécrétion de MIG par les cellules épithéliales pharyngeales (Eliasson *et al.*, 2007).

II.2.7. MCP-1 ou CCL2

MCP-1 ou « Monocyte Chemoattractant Protein » est une chimiokine de la famille CC, qui est produite par un grand nombre de cellules, telles que les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les cellules épithéliales, les kératinocytes et les cellules pulmonaires. Les inducteurs de cette chimiokine sont nombreux et comprennent de nombreuses cytokines (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ g, IL-4...), des bactéries (*Streptococcus, Mycobacterium, E. coli*), des composants bactériens (LPS, LTA...) (Graveline *et al.*, 2007 ; Tong *et al.*, 2003 ; Kohwiwattanagun *et al.*, 2007 ; Luo *et al.*, 2007 ; Von Aulock *et al.*, 2003) et des virus (Influenzae, protéine LMP1 du EBV) (Dessing *et al.*, 2007, Buettner *et al.*, 2007). L'infection par *S. aureus* d'ostéoblastes ou de cellules endothéliales humaines entraîne une augmentation de la sécrétion de MCP-1 (Bost *et al.*, 2001 ; Tekstra *et al.*, 1999). Les rôles biologiques de MCP-1 sont nombreux selon le type cellulaire concerné. C'est une chimiokine pro-inflammatoire qui a la particularité de mobiliser le calcium intracellulaire des monocytes, des lymphocytes et des macrophages, tout en ayant un effet chimioattractant sur ces cellules. MCP-1 est le ligand de CCR2.

II.2.8. RANTES ou CCL5

RANTES « Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted » est une chimiokine pro-inflammatoire de la famille CC, qui fut isolée pour la première fois en 1988 à partir de lymphocytes T stimulés (Rollins, 1997). Cette protéine est produite par les lymphocytes T, les fibroblastes, les macrophages, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales et les plaquettes (Thomson, 1994). Elle est chimioattractante pour les lymphocytes T de type mémoire, les monocytes, les cellules dendritiques, les éosinophiles et les basophiles. *In vivo*, l'injection sous-cutanée de RANTES dans différents modèles animaux entraîne le recrutement de lymphocytes et de monocytes (Nelson *et al.*, 1997). RANTES peut se lier à trois récepteurs : le CCR1, le CCR3 et le CCR5. Suite à certaines infections bactériennes ou virales, comme l'infection au métapneumovirus humain, la production de RANTES est augmentée (Bao *et al.*, 2007). La protéine LMP1 du EBV augmente également la production de RANTES par les cellules épithéliales (Buettner *et al.*, 2007). Matsui *et al.* ont montré que le peptidoglycane de *S. aureus* augmentait la production de RANTES *in vivo* chez des souris qui ont été infectées par le peptidoglycane et *in vitro* par des cellules de Langerhans (Matsui *et al.*, 2007).

II.2.9. Eotaxine ou CCL11

L'éotaxine est une autre chimiokine pro-inflammatoire de la famille CC. Elle fut isolée pour la première fois de LBA de cochons d'inde développant une réaction allergique (Jose *et al.*, 1994). Cette chimiokine est caractérisée par sa capacité à attirer spécifiquement les éosinophiles (Collins *et al.*, 1995). L'éotaxine peut être produite par les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les macrophages alvéolaires et les éosinophiles (Hemelaers et Louis, 2006). Elle est exprimée d'une façon constitutive dans différents organes comme le cœur et le poumon, et son expression peut être augmentée suite à des stimulations par des antigènes (Rothenberg *et al.*, 1995a et 1995b ; Gonzalo *et al.*, 1996). Par exemple, le virus Influenzae A induit une augmentation de la production de l'éotaxine par les cellules épithéliales (Kawaguchi *et al.*, 2000). Chez la souris, l'exposition bronchique et nasale à l'entérotoxine B de *S. aureus* entraîne une augmentation de la sécrétion d'éotaxine (Hellings *et al.*, 2006). L'éotaxine attire les éosinophiles *via* un récepteur spécifique le CCR3 qui est également un des récepteurs de RANTES (Kitaura *et al.*, 1996).

II.2.10. MIP-3β ou CCL19

MIP-3 β ou « Macrophage Inflammatory Protein 3 β » ou ELC (EBI1-ligand chemokine) est une chimiokine homéostatique de la famille CC. MIP-3 β se fixe spécifiquement sur le CCR7 (Yoshida *et al.*, 1997). Elle est exprimée d'une façon significative dans le thymus. Elle attire les lymphocytes T matures et immatures, les lymphocytes B et les cellules dendritiques mais n'attire pas les monocytes ni les granulocytes (Kim *et al.*, 1998a et 1998b ; Kellermann *et al.*, 1999).

III. Les cellules immunitaires

Différentes populations cellulaires sont impliquées dans l'immunité locale de la muqueuse respiratoire. Ces cellules sont réparties en 2 grandes catégories : les cellules lymphoïdes liées aux organes lymphoïdes et les cellules phagocytaires (lignée myéloïde) capables d'ingérer des particules inertes ou vivantes (Figure 14).



Figure 14. Précurseurs des cellules sanguines.

La cellule souche hématopoïétique se différencie en cellule souche pluripotente, qui se différencie à son tour en progéniteurs lymphoïdes ou myéloïdes. Les progéniteurs lymphoïdes se différencient ensuite en lymphocytes T, B et NK. Les progéniteurs myéloïdes donnent naissance aux globules rouges, plaquettes, basophiles, neutrophiles, éosinophiles et monocytes. Les monocytes peuvent se différencier à leur tour en macrophages ou en cellules dendritiques.

III.1. Les cellules phagocytaires

La phagocytose correspond à l'endocytose et à l'inactivation ou la destruction des agents pathogènes. Elle concerne les lignées de granulocytes et de monocytes/macrophages, issues du même précurseur pluripotent appelé « cellule myéloïde ».

III.1.1. Les granulocytes

Les granulocytes, appelés polynucléaires à cause de l'aspect plurilobé de leur noyau en microscopie conventionnelle, comprend les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles.Les polynucléaires neutrophiles (PNN) sont le type cellulaire le plus produit par l'organisme, 10 milliards par jour chez un adulte normal. Leur durée de vie n'est cependant que de quelques heures dans la circulation. Dans les conditions physiologiques, les neutrophiles ont un rôle protecteur vis-à-vis des infections bactériennes et fongiques, grâce aux nombreuses molécules actives qu'ils produisent (Table 7).

Facteurs antimicrobiens	Myéloperoxidase, Défensines, Lactoferrine
Protéases	Elastase, Cathépsine G,
	Collagénase, Stromélysine, Gélatinase
Hydrolases acides	
Dérivés de l'oxygène	Ions superoxyde, Peroxyde d'hydrogène,
	Radicaux d'hydrogène, Oxygène singulet
Lipides bioréactifs	Leucotriène B4, Platelet activating factor
Cytokines	IL-1, IL-3, IL-6, IL-8, MIP-1, TNF- α , TGF- β , G-
	CSF, GM-CSF, M-CSF

Table 7. Molécules sécrétées par les polynucléaires neutrophiles.

En cas d'infection, la production de neutrophiles est multipliée par 10 en quelques jours. Les polynucléaires sont des cellules très mobiles. Sous l'influence de différents stimuli, ils adhèrent à la paroi vasculaire et migrent vers les tissus. Le déplacement des polynucléaires vers des substances chimioattractantes, tels que les chimiokines, est désigné sous le nom de chimiotactisme (Rollins, 1997). La progression normale d'un phénomène inflammatoire est dominée par une phase d'afflux de neutrophiles suivie d'une phase de prépondérance macrophagique.

Les éosinophiles sont incapables de se diviser et sont caracterisées par leurs uniques granules cristalloïdes qui contiennent quatre protéines basiques fortement cytotoxiques. Les éosinophiles sont capables d'être cytotoxiques contre les parasites. Les produits libérés par les éosinophiles peuvent provoquer des processus physiopathologiques (asthme) et des maladies plus rares (pneumonies chroniques à éosinophiles).

III.1.2. Les monocytes et les macrophages

Les monocytes/macrophages sont considérés comme des phagocytes « professionnels » dont le rôle principal est d'assumer la défense de l'hôte envers les agents infectieux. Les monocytes sont des précurseurs pour plusieurs types cellulaires observés au niveau tissulaire, dont les macrophages. Les monocytes restent en moyenne de 6 à 8h dans le sang et migrent dans les tissus, dont le poumon, où ils prennent des noms différents selon le tissu concerné. Au niveau pulmonaire, on parle de macrophages alvéolaires qui auraient un rôle d'effecteurs mais ne seraient pas des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) pour les lymphocytes T, en raison d'un déficit en molécules co-stimulatrices de surface (Isler et al., 2000). Les macrophages libres passent dans la lumière de l'arbre respiratoire, phagocytent les agents pathogènes et sont éliminés par le biais de la clairance mucociliaire. Cependant, les cytokines qu'ils produisent, notamment l'IL-12, influencent la réponse spécifique des lymphocytes T. Les macrophages constituent la première défense contre les pathogènes inhalés et ont un comportement pro-inflammatoire plus marqué que les monocytes circulants.

III.2. Les cellules dendritiques

Ces cellules sont présentes dans tous les tissus, sauf dans le cerveau et la cornée. Dans l'épithélium respiratoire, les cellules dendritiques se trouvent à l'interface avec le milieu extérieur. Les cellules dendritiques présentes dans les tissus périphériques sont peu matures et ne stimulent que faiblement les populations lymphoïdes. Dans l'appareil respiratoire, les cellules dendritiques sont peu présentes dans la muqueuse et l'épithélium de surface, mais constitueraient les principales CPA (Holt, 2000). Le renouvellement des cellules dendritiques est rapide (< 48h) et leur migration vers l'épithélium de surface est fortement accrue en cas d'infection (McWilliam *et al.*, 1996).

III.3. Les lymphocytes

Les lymphocytes ont été morphologiquement identifiés il y a plus de 100 ans. Ils présentent 2 types de morphologie : les petits lymphocytes (7 à 8 μ m de diamètre) et les grands lymphocytes (9 à 15 μ m de diamètre). La plupart des lymphocytes du sang périphérique sont de petite taille. Ils constituent les cellules centrales du système immunitaire responsables de l'immunité acquise. Dans un organisme, les lymphocytes représentent 20 à 40 % des leucocytes du sang et 99 % des cellules de la lymphe. Il y a approximativement 10¹¹

lymphocytes dans le corps humain (ce chiffre varie en fonction de la taille et de l'âge : entre 10^{10} et 10^{12}). Les lymphocytes circulent dans le sang et la lymphe de façon continue et sont capables de migrer dans les espaces tissulaires et les organes lymphoïdes. Les lymphocytes peuvent être grossièrement divisés en trois populations, que rien (ou presque) ne différencie sur le plan morphologique : les lymphocytes T (LT), les lymphocytes B (LB) et les cellules nulles (non-B, non-T) ou « natural killer » (NK). Seuls leurs marqueurs de surface permettent de les différencier par cytométrie en flux.

III.3.1. Les « Natural Killer »

Les NK (Natural Killer) sont des lymphocytes non-T non-B de grande taille qui présentent des granules intracytoplasmiques d'où leur nom de grands lymphocytes à granules ou LGL (Large Granular Lymphocytes). Ils constituent environ 5 à 7% des leucocytes. Les NK exercent de manière spontanée une activité cytotoxique vis-à-vis de cibles tumorales ou infectées par des pathogènes intracellulaires ou par des virus. Par ailleurs, les NK expriment des récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines et de ce fait peuvent être « armées » par des anticorps pour exercer une activité cytotoxique dépendante des anticorps ou ADCC (Antibody Dependant Cell Mediated Cytotoxicity).

III.3.2. Les lymphocytes B

Les LB doivent leur nom à la bourse de Fabricius chez les oiseaux, ou la moelle osseuse « bone marrow » où ils poursuivent leur maturation chez l'Homme. Ils représentent 10 à 15 % des lymphocytes circulants. On les trouve dans la rate et les organes lymphoïdes secondaires où ils interagissent avec les cellules dendritiques et les LT (Clark et Lane, 1991). Activés, les LB se différencient en plasmocytes suivant le principe d'expansion clonale. Les LB portent des molécules du CMH de classe II à leur surface, et de ce fait ils ont une fonction de cellules présentatrices de l'antigène vis-à-vis des LT. Leur récepteur spécifique, BCR (B Cell Receptor) est constitué d'immunoglobulines membranaires. Les plasmocytes produisent de grandes quantités d'immunoglobulines correspondant au récepteur engagé dans la reconnaissance d'un antigène spécifique. Ils sont particulièrement nombreux dans la muqueuse respiratoire.

III.3.3. Les lymphocytes T CD3

Les LT sont issus de cellules souches originaires de la moelle osseuse mais leur maturation a lieu dans le thymus où ils subissent une sélection durant laquelle 95 % des cellules sont éliminées. Les LT sont ensuite libérés sous forme de cellules naïves. Le thymus n'a cependant qu'un rôle limité dans le temps et s'atrophie avec l'âge (après la dixième année chez l'homme). Cette dégénérescence précoce est compensée par le nombre élevé de LT circulants, dont les LT mémoires au repos, capables de retourner vers le tissu où elles ont une grande probabilité de rencontrer à nouveau leur antigène spécifique.

Les LT reconnaissent des fragments d'antigène présentés par les molécules du CMH via leur récepteur de surface appelé TCR (T Cell Receptor). Ce récepteur est un complexe constitué de six chaînes polypeptidiques, dont un hétérodimère $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ (liaison à l'antigène) et des chaînes CD3 ε , γ et δ (Wange et Samelson, 1996). Les chaînes polypeptidiques ε , γ et δ de la molécule CD3 sont associées entre elles sous la forme d'hétérodimères CD3 $\delta\epsilon$ et CD3 $\gamma\epsilon$, et à un homodimère de chaînes ζ (CD247), une chaîne commune à plusieurs récepteurs. L'ensemble est physiquement associé au TCR, par des interactions entre acides aminés chargés + et - au niveau de leurs segments transmembranaires. Les différents composants de CD3 à la différence du TCR, possèdent un important domaine cytoplasmique dont la fonction est de transmettre un signal d'activation intracellulaire lorsque le TCR est engagé dans une interaction avec l'antigène. La molécule CD3 est invariante ; elle est présente sur la membrane de tous les LT dès lors qu'ils expriment un TCR, et constitue un bon marqueur pour les identifier. La plupart des anticorps anti-CD3 disponibles reconnaissent le composant CD3ɛ. Les LT CD3 représentent 65 à 80 % des lymphocytes circulants. Les LT sont subdivisés en deux sous-populations fonctionnelles et identifiables par des marqueurs de surface. Les CD4 qui constituent 2/3 des LT CD3 et les CD8 qui forment 1/3 des LT CD3 (Snow, 1994). La maturation de certaines sous-populations de LT est possible en dehors du thymus. Ces cellules ne portent pas de molécules accessoires CD4 et CD8. Elles recirculent peu et n'ont pas besoin des organes lymphoïdes secondaires. C'est le cas des LT portant un TCR de type $\gamma\delta$ qui sont capables de reconnaître un antigène natif, propriété qui les rapproche des NK et des macrophages. Les LT $\gamma\delta$ sont particulièrement nombreux dans les épithéliums où ils peuvent réagir rapidement à la présence d'agents infectieux. Ils initieraient et réguleraient ainsi la réponse par les cellules de type $\alpha\beta$ et les LB (Boismenu et Havran, 1997).

III.3.3.1. Les lymphocytes T CD8

Ces LT, qui expriment la molécule CD8, sont également appelés « lymphocytes cytotoxiques ». Ils se lient spécifiquement aux cellules infectées par des agents infectieux intracellulaires (virus,...) ou aux cellules tumorales qui présentent à leur surface des marqueurs cellulaires spécifiques. A l'issue de cette reconnaissance, les CD8 libèrent des substances toxiques pour les cellules, telles que les perforines. Ces perforines s'insèrent, par groupes, dans la membrane de la cellule cible, formant des pores dans celle-ci. Ces pores provoquent l'entrée de liquide extracellulaire dans la cellule cible par un phénomène d'osmose, et entraînent sa mort par un mécanisme dit de « lyse osmotique ».

III.3.3.2. Les lymphocytes T CD4

Les LT auxiliaires ou helper (Th) appartiennent à la population caractérisée par la présence de la molécule CD4 (T CD4). La molécule CD4 est une glycoprotéine qui a pour ligand l'une des formes des molécules du CMH, les molécules HLA de classe II. Les LT CD4 coordonnent la réponse immunitaire spécifique. Ils amplifient la réponse immunitaire face à un agent pathogène, en stimulant l'activité des autres cellules de l'immunité, tels les LB, les LT CD8 et les macrophages. Ils exercent leurs fonctions entre autre par le biais de médiateurs solubles comme les cytokines, qu'ils sécrètent lorsqu'ils sont activés par l'antigène.

III.3.3.3. La polarisation des lymphocytes T

La classification des LT CD4 en sous-groupes Th1 et Th2 a originellement été définie chez la souris par Mosmann (Mosmann *et al.*, 1986). En fonction de l'environnement cytokinique, les LT CD4 naïfs, ou Th0, se différencient en Th1 ou Th2 en inhibant la différentiation vers l'autre profil (Glimcher et Murphy, 2000). Les Th0 peuvent aussi se différencier en Treg et Th17 (Figure 15).


Figure 15. Polarisation des lymphocytes T (Afzali et al., 2007).

III.3.3.3.a. La polarisation de Th0 en Th1 et Th2

La présence de l'IL-12 entraîne l'orientation d'un clone Th0 vers un profil Th1 en activant la voie de signalisation STAT-4. Les Th1 sont caractérisés par l'expression de T-bet et produisent de l'IL-2, de l'IFN γ et du TNF α . Ces cytokines sont impliquées dans le recrutement des macrophages, dans l'activation de la réponse immunitaire cellulaire conduisant à l'élimination des pathogènes intracellulaires (ex : virus) et des cellules cancéreuses, et dans la prévention des réactions d'hypersensibilité de la peau (Pulendran, 2004). La différentiation des Th0 en Th2 est induite par l'IL-4 via la voie de signalisation STAT-6. Les Th2 sont caractérisés par l'expression de GATA-3. Les cellules Th2 induisent l'immunité humorale, permettant aux LB grâce à la sécrétion d'anticorps de participer à la destruction des organismes extracellulaires. Ces cellules sécrètent essentiellement de l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-10 et l'IL-13. Les cytokines produites lors d'une réponse Th2 favorisent la croissance et l'activation des éosinophiles et des basophiles. L'équilibre entre les deux souspopulations Th1 et Th2 permet de maintenir une homéostasie fonctionnelle générant une réponse immunitaire appropriée (Kidd, 2003). Les chimiokines jouent un rôle important dans la polarisation et la mise en place d'une réponse Th1/Th2. MIP-1a, MIP-1b et RANTES orientent la différentiation Th0 vers Th1, tandis que MCP-1 l'oriente vers Th2 (Luther et Cyster, 2001). Les Th1 produisent préférentiellement MIP-1a, RANTES, MIG et IP-10. Tandis que les Th2 sont associés à une production de MCP-1, MCP-3, éotaxine, I-309, SDF et TARC (Dong et Flavell, 2001) (Figure 16).



Figure 16. Polarisation de Th0 en Th1 et Th2.

En outre, les Th1 expriment préférentiellement les récepteurs CCR5, CCR1 et CXCR3 alors que les Th2 expriment CCR3, CCR4, CCR8 et CXCR4. Ainsi, les chimiokines, par le biais de l'expression de leurs récepteurs sur les lymphocytes, permettent d'attirer sur leurs sites de production des populations lymphocytaires spécifiques. L'expression de CXCR1 et CXCR2, les récepteurs de l'IL-8, sur les lymphocytes, ne semble pas être liée au profil Th1 ou Th2.

III.3.3.3.b. La polarisation de Th0 en Treg

Les Treg sont retrouvées essentiellement dans le sang, le thymus, la rate et les ganglions lymphatiques. Ils constituent 6 à 10 % des LT CD4+ présents dans ces organes (Shevach, 2002 ; Sakaguchi, 2005). La différentiation des Treg a lieu dans le thymus et nécessite la présence de TGF- β , ensuite les Treg migrent vers les organes lymphoïdes et les tissus périphériques. Il existe au moins deux types de LT régulateurs. Le premier type comprenant les Tr1 et les Th3, contrôle la réponse immunitaire *via* la sécrétion de cytokines. Les Tr1 et les Th3 produisent respectivement de l'IL-10 et du TGF β (Cottrez *et al.*, 2000 ; Groux *et al.*, 1997 ; Weiner, 2001). Le second type correspond aux Treg dits naturels (Sakaguchi *et al.*, 1995). Ce type agit par contact direct avec d'autres cellules. Chez la souris, les Treg naturels sont caractérisés par l'expression constitutive de CD25. Chez l'Homme, les les LT CD4 exprimant un très haut niveau de CD25 correspondent en majeure partie à des

Treg. A l'heure actuelle, on considère que l'expression du facteur de transcription Foxp3 est spécifique des Treg (Hori *et al.*, 2003 ; Fontenot *et al.*, 2003) (Figure 15). Les Treg inhibent *in vitro* la prolifération des LT CD4+ et CD8+, et la sécrétion de cytokines par ces cellules en réponse à des stimuli. Les Treg diminuent également la réponse des LT CD8, des NK et des LT CD4 aux antigènes spécifiques (Dieckmann *et al.*, 2001 ; Wing *et al.*, 2003). Les Treg possèdent plusieurs fonctions *in vivo* en plus du maintien de la tolérance au Soi telles que le contrôle de l'allergie, la régulation des réponses aux agents pathogènes et la prévention du rejet de greffe (Baecher-Allan et Hafler, 2006 ; Umetsu et Dekruyff, 2006, Rouse *et al.*, 2006, Belkaid *et al.*, 2006 ; Waldmann *et al.*, 2006). Des études *in vitro* ont montré que la signalisation *via* le TCR est importante pour le fonctionnement des Treg. D'autres études *in vivo* montrent un rôle important de la production d'IL-10 et de TGF β comme médiateurs de l'activité des Treg, qui peuvent interagir avec la cellule à petite distance ou par contact direct (Dieckmann *et al.*, 2002 ; Nakamura *et al.*, 2004 ; Nakamura *et al.*, 2001).

La migration des Treg vers les organes et les tissus implique plusieurs chimiokines et récepteurs des chimiokines. Le CXCL12 et le CXCR4 induisent la migration des Treg vers la moelle osseuse (Zou *et al.*, 2004). Le CCL22 et le CCR4 permettent leur migration vers les ovaires humains présentant un cancer et vers les greffons cardiaques de souris (Curiel *et al.*, 2004 ; Lee *et al.*, 2005). Le CXCL19 et le CCR7 facilitent la migration des Treg vers les organes lymphoïdes (Lim *et al.*, 2004). Certaines chimiokines de la famille CC (CCL2, 3, 4, 5, 7 et 13) et leurs récepteurs le CCR2 et le CCR5 permettent la migration des Treg vers les sites d'inflammation (Bruhl *et al.*, 2004 ; Wysocki *et al.*, 2005) (Figure 17).



Figure 17. Migration des Treg vers les tissus et organes (Wei et al., 2006).

III.3.3.3.c. La polarisation de Th0 en Th17

Les LT produisant de l'IL-17, appelés Th17, ont été récemment identifiés comme une nouvelle classe de LT effecteurs, différente des Th1, Th2 et Treg. Les Th17 se développent en présence de l'IL-6 et du TGF β , et cette étape de différentiation est fortement inhibée par les cytokines Th1 et/ou Th2 (Figure 18). La signalisation *via* l'IL-6 active Stat3 et le facteur de transcription ROR γ t. La signalisation *via* le récepteur du TGF β , le TGFRII, est aussi essentielle pour la différentiation des Th17, puisque les LT déficients en TGFRII ne peuvent pas se différencier en Th17. En présence d'IL-23, les Th17 sécrètent de l'IL-22 (Stockinger et Veldhoen, 2007). L'IL-27, quant à elle, inhibe la différentiation des Th17.



Figure 18 Polarisation des Th0 en Th17 (Stockinger et Veldhoen, 2007).

L'IL-17 est un médiateur pro-inflammatoire possédant de multiples fonctions. Localement, l'IL-17 stimule la production de l'IL-6, de l'oxyde nitrique (NO) et de la prostaglandine E2 (PGE2). Elle agit également en synergie avec d'autres cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 β , le TNF α , l'IFN γ et le CD40L, aboutissant à l'amplification de l'inflammation (Afzali *et al.*, 2007). L'IL-17 induit le chimiotactisme des neutrophiles et des monocytes vers les sites d'inflammation *via* des médiateurs chimioattractants, tels que l'IL-8, MCP-1 et GRO α . Elle augmente la production de facteurs de croissance hematopoïétiques tels le G-CSF et le GM- CSF, qui induisent la maturation et la croissance des cellules recrutées. De plus, l'IL-17 agit comme un « pont » entre l'immunité innée et l'immunité adaptative en augmentant l'induction de molécules de co-stimulation tels que l'ICAM-1 par d'autres cytokines, activant ainsi les LT (Figure 19).



Figure 19. Effets pro-inflammatoires de l'IL-17 (Afzali et al., 2007).

III.3.4. Le chimiotactisme des LT

Le chimiotactime est le déplacement orienté des cellules dont la migration se fait le long d'un gradient de chimiokines. Il implique la perception de subtiles différences dans la concentration en chimiokines, et l'établissement d'une polarité mettant en jeu des modifications du cytosquelette et des interactions adhésives avec la matrice extracellulaire. De plus, les chimiokines contrôlent la navigation des cellules et leur arrêt au contact des cellules endothéliales, préalable à leur passage vers les tissus où sont exprimés les facteurs chimioattractants, indirectement par une activation des intégrines secondaire à la liaison des chimiokines à leurs récepteurs leucocytaires (Von Adrian et Mempel, 2003 ; Miyasaka et Tanaka, 2004). La grande variété de récepteurs de chimiokines et des chimiokines, ajoutée à la diversité des molécules d'adhérence, offre de multiples possibilités d'adressage et d'orientation utilisables par les lymphocytes pour se diriger vers de multiples localisations. Le CCR7 est exprimé sur tous les LT naïves mais aussi sur certains LT mémoires au repos (Sallusto *et al.*, 1999). Les ligands du CCR7 jouent un rôle important dans l'entrée des LT naïves dans les ganglions lymphatiques. MIP-3 β (ligand du CCR7) permet la transmigration des LT à travers la barrière endothéliale mais également l'orchestration de la co-localisations dans la zone T de LT naïves et des cellules dendritiques nécessaires à leur activation (Banchereau et Steinman, 1998; Sprent et Surh, 2002). En plus du CCR7, les LT naïves expriment le CCR9 et le CXCR4 qui permettent, grâce à leurs ligands (TECK et SDF-1 respectivement), le recrutement des LT naïves dans les ganglions lymphatiques (Kunkel *et al.*, 2000, Papadakis *et al.*, 2000; Okada *et al.*, 2002; Phillips et Ager, 2002). Après la rencontre avec les cellules dendritiques, les LT acquièrent le CXCR5 qui va permettre leur migration vers les follicules où la production de son ligand, le BCA1 ou CXCL13, a lieu.

Les LT effecteurs expriment plusieurs récepteurs de chimiokines permettant leur migration vers les sites d'inflammation. Les récepteurs CCR1, CCR2, CXCR3, CCR5, CX3CR1 et CXCR6 sont des récepteurs de chimiokines pro-inflammatoires qui permettent la migration des LT effecteurs de type 1 (Th1) et des cellules cytotoxiques vers le site d'inflammation (Kim *et al.*, 2001 ; Weninger *et al.*, 2002). CCR3, CCR4 et CCR8 permettent la migration des Th2 vers le site d'inflammation. Il a été décrit que les LT expriment le CXCR1, récepteur exprimé préférentiellement sur les neutrophiles, ce qui suggère que l'IL-8, ligand du CXCR1, peut réguler la migration des LT effecteurs vers les sites d'inflammation (Tani *et al.*, 1998 ; Takata *et al.*, 2004 ; Hess *et al.*, 2004). Les LT expriment également le CXCR2, récepteur de l'IL-8 et de GROα (Tani *et al.*, 1998).

III.3.5. Les lymphocytes T et l'inflammation pulmonaire

Les principales structures lymphoïdes se situent le long des voies aériennes. Le tissu lymphoïde associé aux bronches est très peu développé chez les humains contrairement à ce que l'on peut observer chez les rats et les souris. Ainsi, c'est surtout dans les structures lymphoïdes autour des bifurcations des bronches de moyen et de gros calibre que les cellules dendritiques ou les macrophages vont présenter des antigènes pour induire une réponse immune cellulaire ou humorale. Les lymphocytes ainsi sensibilisés peuvent alors entrer dans la circulation pour se redistribuer au niveau des muqueuses de l'arbre respiratoire. Chez des sujets sains, les lymphocytes sont observés dans l'épithélium respiratoire, préférentiellement au niveau proximal, de façon isolée et passent peu dans la lumière (Breeze et Wheeldon, 1977 ; Fournier *et al.*, 1989). Ces lymphocytes seraient de façon prédominante du sous-type CD8 alors que ceux du sous-type CD4 seraient prédominants en-dessous de l'épithélium. Les biopsies bronchiques de malades avec un asthme léger montrent une infiltration de la partie basale de l'épithélium où prédominent les LT CD4 activés dans un rapport CD4/CD8 de 3/1

(Azzawi *et al.*, 1990). Chez les fumeurs présentant une bronchite chronique, le nombre de LT CD8 a tendance à augmenter par rapport aux LT CD4 (O'Shaughnessy *et al.*, 1997).

D'une manière générale, suite aux infections respiratoires bactériennes et virales, une réponse immunitaire protectrice de type Th1 est mise en place. Cette réponse Th1 intervient également dans certaines maladies inflammatoires chroniques. Par contre, une réponse Th2 est prédominante lors des infections parasitaires et fongiques. Chez les souris, l'infection pulmonaire chronique à *P. aeruginosa* entraîne une augmentation de la production d'IL-12 et donc une réponse de type Th1 (Moser et al., 2002). Cependant, certains pathogènes, comme Mycoplasma pulmonis peuvent induire à la fois une réponse Th1 et une réponse Th2, ou simplement une réponse Th2. La bronchiolite sévère induite par le virus respiratoire syncytial développe une réponse Th2 caractérisée par la production d'IL-9 (McNamara et al., 2004). Dans l'emphysème, on observe une accumulation dans les poumons de lymphocytes Th1. Cette reponse Th1 est également observée chez les patients atteints de la BPCO et est associée à une augmentation de la sécrétion d'IP-10 (Barnes et Cosio, 2004). Dans l'asthme allergique, une réponse Th2 est prédominante dans l'inflammation bronchique, caractérisée par la production de quantités importantes d'IL-4, IL-5 et IL-13 et associée à une éosinophilie bronchique et une hypersécrétion de mucus (Busse et Lemanske, 2001). L'asthme atopique induit également une réponse de type Th2 caractérisée par la production d'IL-4 et l'absence d'IL-5 (Brugnoni et al., 1996). Les Treg permettent de supprimer ou prévenir l'auto-immunité en s'opposant aux lymphocytes impliqués dans des réactions auto-immunes. Chez les souris allergiques, il a été montré que les Treg, induits par l'administration de Mycobacterium tué par la chaleur, sécrètent de l'IL-10 et du TGF β et suppriment le recrutement pulmonaire des éosinophiles (Zuany-Amorim et al., 2002a et b). L'importance de l'IL-17 dans l'immunité respiratoire a été mise en évidence par la susceptibilité des souris déficientes pour l'IL-17R, le récepteur de l'IL-17, aux infections pulmonaires fatales. Cette susceptibilité peut être corrélée avec une dérégulation de la mobilisation des neutrophiles et de la clairance bactérienne (Ye et al., 2001a; Ye et al., 2001b; Hoshino et al., 2000). Chez les souris et les rats, les LT activés issus des tissus pulmonaires produisent des quantités importantes d'IL-17, induisant la production de chimiokines et favorisant l'infiltration des neutrophiles (Miyamoto et al., 2003; Laan et al., 1999; Happel et al., 2003). Les cellules épithéliales respiratoires humaines stimulées par l'IL-17 produisent des molécules chimioattractantes, mais dans des conditions physiologiques normales, on retrouve très peu d'IL-17 dans les LBA humains (Laan et al., 2002). Par contre, dans des conditions inflammatoires, la sécrétion d'IL-17 et le recrutement de neutrophiles augmentent dans les LBA des patients (Laan et al., 2002). C'est le cas par

exemple des patients asthmatiques chez lesquels on observe également une augmentation du recrutement des cellules sécrétrices d'IL-17 notamment les LT et les éosinophiles (Molet *et al.*, 2001; Barczyk *et al.*, 2003). L'IL-17 stimule également la sécrétion de mucines et la production de protéines antimicrobienness par les cellules épithéliales respiratoires (Chen *et al.*, 2003).

LA MUCOVISCIDOSE

I. Généralités

La mucoviscidose est la maladie génétique la plus fréquente dans les populations d'origine Caucasienne (Bobadilla *et al.*, 2002). La fréquence de la maladie varie entre 1/2000 et 1/3000 (Zielenski et Tsui, 1995), et environ une personne sur 50 est porteuse du gène muté. En France aujourd'hui, 6000 malades sont atteints de la mucoviscidose dont 33 % ont plus de 18 ans. L'espérance de vie des patients atteints de la mucoviscidose ne cesse d'augmenter et actuellement elle atteint les 36,8 ans, alors qu'elle était de l'ordre de 6 mois en 1938 (Figure 20) (Orenstein *et al.*, 2002). La mucoviscidose affecte principalement les fonctions respiratoires, digestives, génitales et cutanées. Cependant, les infections respiratoires sont responsables de 90% de la morbidité et de la mortalité des patients atteints par la mucoviscidose.





L'espérance de vie des patients mucoviscidosiques était de 2 ans en 1950, et de 36,8 ans en 2006.

Cette pathologie se caractérise par une inflammation massive avec une infiltration massive de cellules immunitaires telles que les neutrophiles et les lymphocytes, une infection chronique des voies aériennes et une colonisation bactérienne essentiellement par *S. aureus* et *P. aeruginosa.* L'inflammation et l'infection conduisent progressivement à une bronchectasie, une destruction pulmonaire et une insuffisance respiratoire.

II. Historique

Bien que le spectre clinique global de la mucoviscidose n'a pas été établi avant 1930, certains aspects de la mucoviscidose ont été identifiés bien avant. En effet, dès 1700 des publications suisses et allemandes établissaient des liens entre le manque de sel dans la mucoviscidose et la maladie. En 1938, la mucoviscidose fut reconnue par Dr. Andersen, sur des enfants mal nourris, leurs autopsies ont révélé des obstructions des canaux glandulaires pancréatiques par le mucus. Elle a émis l'hypothèse que la mucoviscidose est une maladie récessive et était la première à avoir utilisé l'enzyme pancréatique pour le traitement des enfants malades. Initialement appelée « mucoviscidosis » en 1944, cette maladie est caractérisée par des secrétions de mucus abondant et anormalement épais avec des désordres pancréatiques ; elle a donc été renommée « fibrose kystique du pancréas » (« cystic fibrosis », CF pour les anglophones). En 1949, en se basant sur l'hérédité autosomique récessive de la maladie, il a été établi que la mucoviscidose devait être due à un défaut dans un gène unique. Il a été ensuite suggéré que la sueur des patients atteints de la mucoviscidose était anormale, et que le taux de sodium et de chlorure y était 5 fois plus élevé (Davies, 2006). Le test de sueur a été validé en 1983 par Paul Quinton pour le dépistage de la mucoviscidose (Quinton, 1983). En même temps Knowles et ses collaborateurs ont montré que l'hyperabsorption de sodium constituait le défaut principal de la mucoviscidose au niveau des voies aériennes (Knowles et al., 1983). En 1985, la comparaison des génomes de familles de malades suivant la technique RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphism) a permis d'identifier une zone de 30 Mb contenant le gène impliqué dans la mucoviscidose (Tsui et al., 1985). Puis, en 1989, le gène cftr, codant pour un canal chlorure AMPc-dependant de faible conductance et dont la mutation entraîne la maladie, a été découvert (Rommens et al., 1989, Riordan et al., 1989; Kerem et al., 1989). L'identité de ce gène a été vérifiée en utilisant des cellules dérivées des canaux sudoripares.

III. La protéine CFTR

Le gène cftr est situé sur le bras long du chromosome 7 (7q31-3) (Tsui *et al.*, 1985). Son clonage a été décrit en 1989. Ce gène est composé de 27 exons de 230 Kb qui sont transcrits en un ARNm de 6,5 Kb (4,5 Kb codant). Ce dernier code pour une protéine de 1480 acides aminés, la protéine CFTR (Figure 21).



Figure 21. Gène cftr et protéine correspondante (Gibson et al., 2003).

Le gène CFTR est localisé sur le bras long du chromosome 7 et il est constitué de 27 exons qui codent les 1480 acides aminés de la protéine CFTR.

III.1. Structure, localisation et fonctions de CFTR

CFTR est une protéine de 170 kDa. Elle présente de fortes homologies avec les membres de la famille des protéines transporteuses ABC (ATP-binding Cassette) (Dean et Allikmets, 1995). Cette protéine est constituée de 5 domaines : 2 segments peptidiques transmembranaires composés chacun de six hélices hydrophobes, 2 domaines hydrophiles NBD (Nucleotide Binding Domain) de liaison à l'ATP, un domaine R constitué de 241 acides aminés et contenant des sites potentiels de phosphorylation des protéines kinases (PK) A et C (Figure 22) (Rosenberg *et al.*, 2004). L'adressage de CFTR au niveau de la membrane plasmique dans les cellules épithéliales nécessite la glycosylation de la protéine.



Figure 22. Structure de la protéine CFTR (Ackerman et Clapham., 1997). CFTR contient 2 domaines de liaison aux nucleotides (NBD) qui lient et hydrolysent l'ATP, 2 domaines transmembranaires (TM) qui forment le canal et un domaine régulateur (R) central. Ce domaine R contient de nombreux sites de phosphorylation pour PKA et PKB.

La protéine CFTR est détectée à la membrane apicale des cellules épithéliales exocrines (Crawford *et al.*, 1991). Sa localisation dépend directement de la polarité cellulaire. En effet, en l'absence de jonctions serrées, les cellules perdent leur polarité et la protéine CFTR est alors retenue au niveau du réseau trans-golgien (Morris *et al.*, 1994). Au niveau des voies aériennes, la proteine CFTR est déjà présente à 7 semaines de gestation au niveau cytoplasmique (Gaillard *et al.*, 1994). Cette expression s'accroît durant les stades ultérieurs du développement fœtal et atteint vers le milieu de la gestation un niveau supérieur à celui détecté dans le poumon adulte (Tresize *et al.*, 1993). En fin de gestation, la protéine adopte une localisation apicale au niveau des cellules ciliées de l'épithélium respiratoire (Puchelle *et al.*, 1992). D'autre part, cette proteine a été localisée et testée fonctionnellement à la surface des lymphocytes T (Yoshimura *et al.*, 1991; Krauss *et al.*, 1992).

Depuis la découverte de la protéine CFTR, plusieurs fonctions lui ont été attribuées, la principale étant son activité de canal chlorure. En effet, les protéines de la famille des ABC fonctionnent comme médiateurs de transport de solutés organiques et incluent entre autres les protéines MDR (Multi Drug Resistance proteins) et les protéines MRP (Multi Drug

Resistance associated proteins), ces dernières étant des protéines de détoxification cellulaire (Lallemand *et al.*, 1997). Après reconstitution de la protéine CFTR dans une bicouche lipidique, il a été montré qu'elle présente une activité canal chlorure de faible conductance (Bear *et al.*, 1992), pouvant être stimulée par l'AMPc et régulée par la PKA. A l'état basal, CFTR est inactif (Sheppard *et al.*, 1994). La fixation et l'hydrolyse de l'ATP au niveau des domaines NBD ainsi que la phosphorylation par la PKA de résidus situés dans le domaine R permettent l'activation et le maintien à l'état actif du CFTR (Akabas, 2000) ; CFTR devient donc perméable laissant passer les ions Cl⁻. Après sa phosphorylation, CFTR est désactivé par des phosphatases (Gadsby et Nairn, 1999) et devient imperméable.

La protéine CFTR régule également l'activité d'autres canaux ioniques de la cellule épithéliale. Elle stimule le canal chlorure de forte conductance ORCC (Outwardly Rectifying Chloride Chanel) *via* l'ATP (Schwiebert *et al.*, 1995). Elle inhibe le canal ENaC (Epithelial sodium Chanel) sensible à l'amiloride (Stutts *et al.*, 1995) et module les canaux potassium ROMK (Rat Outer Medullary K⁺ Chanel) (Loussouarn *et al.*, 1996) (Figure 23). CFTR joue aussi un rôle important dans l'exocytose et la formation de complexes moléculaires dans la membrane plasmique (Bertrand et Frizzell, 2003).



Figure 23. Action de CFTR sur différents canaux ioniques (www.necker.fr). CFTR stimule le canal chlorure de forte conductance ORCC via l'ATP, inhibe le canal ENaC et module les canaux potassium ROMK.

Le rôle du CFTR dans les cellules épithéliales ne se restreint donc pas à la perméabilité du chlore. Chez les patients mucoviscidosiques, l'absence de CFTR influence l'expression d'autres molécules telles que les protéines ayant un rôle important dans la

réponse inflammatoire, les processus de maturation, les transports ioniques et la signalisation cellulaire.

III.2. Mutations du gène CFTR

Le gène CFTR comporte environ 180 000 paires de bases et 1550 mutations ont été recensées à ce jour (4/12/2007) (<u>http://www3.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html</u>) dans la séquence codante, les signaux d'épissage des ARN messagers et d'autres régions. Ces mutations peuvent être classées en 6 classes selon le mécanisme par lequel elles provoquent la maladie (Figure 24).

- Les mutations de classe I affectent la production de la protéine. Il y a alors absence totale ou partielle de la protéine liée à des mutations non-sens (G542X), des mutations d'épissage (1717 : 1G → 1A) et des mutations entraînant un déphasage de lecture situées sur l'ARN messager codant pour la protéine CFTR.
- Les mutations de classe II touchent l'étape de biosynthèse. La protéine reste localisée dans le cytoplasme et est dégradée. Très peu de protéines fonctionnelles arrivent à la membrane apicale de l'épithélium. La mutation ΔF508 fait partie de cette classe. C'est la mutation la plus répandue au monde (70% des cas) et correspond à la délétion de 3 nucléotides (CTT) entraînant la perte d'une phénylalanine en position 508.
- Les mutations de classe III touchent l'activation et la régulation du canal chlore. Ce sont des mutations faux-sens au niveau des sites de liaison de l'ATP (NBD1 et 2) ou dans le domaine R qui aboutissent à une altération de la fonction de la protéine CFTR, régulée par la concentration en ATP cytosolique. Il s'agit d'un défaut d'activation du canal qui conduit à une conductance très réduite des ions Cl⁻.
- Les mutations de classe IV touchent également la fonction du canal CFTR. Elles affectent la conductance et les mécanismes d'ouverture et de fermeture du canal. Elles incluent les mutations dans les domaines transmembranaires.
- Les mutations de classe V incluent des mutations dans le promoteur et des mutations qui modifient l'épissage alternatif ou qui provoquent une synthèse de la protéine inefficace et donc une réduction du nombre de transcrits de CFTR.
- Les mutations de classe VI affectent la stabilité de CFTR à la surface cellulaire.



Figure 24. Différentes classes de mutation de CFTR (Rowe et al., 2005).

Les différentes classes de mutation du gène cftr sont : classe I (absence de synthèse), classe II (défaut de maturation et dégradation prématurée), classe III (mauvaise régulation), classe IV (défaut de la conductance du chlore ou fermeture du canal), classe V (diminution du nombre de transcrits) et classe VI (turnover accéléré de la surface cellulaire).

IV. Pathologie respiratoire

La pathologie respiratoire constitue la principale cause de morbidité et de mortalité des patients atteints de la mucoviscidose. CFTR joue un rôle majeur dans cette pathologie *via* son implication dans les modifications du liquide de surface respiratoire, des infections et de l'inflammation observés dans la mucoviscidose.

IV.1. Modifications du liquide de surface

Des études réalisées chez l'animal et chez l'Homme ont montré que le transport du mucus au niveau des voies aériennes de conduction serait diminué dans les pathologies d'hypersécrétion bronchique rencontrée dans la mucoviscidose (Puchelle *et al.*, 1985 ; Shak *et al.*, 1990). De plus, une étude récente a montré que les propriétés antibactériennes du liquide

de surface sont également diminuées dans la mucoviscidose (Moraes *et al.*, 2006). L'origine de ces altérations reste au centre de nombreux débats. Il est classiquement admis que la mucoviscidose est caractérisée par l'absence de fonctionnalité des canaux chlore CFTR, mais on ne sait pas dans quelle mesure l'absence de fonctionnalité de la protéine CFTR modifie le transport des ions et le degré de salinité du liquide de surface bronchique. Deux hypothèses sont actuellement proposées dans le but d'expliquer les anomalies de clairance mucociliaire observées dans la mucoviscidose (Figure 25).



Figure 25. Modèles hypertoniques et isotoniques de transport d'ions (Wine, 1999). a) hypothèse d'une augmentation de la salinité chez les patients mucoviscidosiques (A2) par rapport à la normale (A1). b) hypothèse de réduction du volume chez les patients mucoviscidosiques (B2) par rapport à la normale (B1).

IV.1.1. Dérégulation des concentrations ioniques : le modèle hypertonique

La première hypothèse, proposée par le groupe de Welsh, est que le liquide de surface des voies aériennes de sujets normaux est relativement peu salé, par le fait que l'épithélium de surface absorbe de grandes quantités de fluide composé d'eau et d'ions (Zabner *et al.*, 1998). Chez les patients CF, les ions CI⁻ sont peu absorbés produisant un liquide de surface contenant des concentrations élevées de NaCl (Figure 25a). L'épithélium des voies aériennes humaines, à l'image de celui des canaux sudoripares, est relativement imperméable à l'eau. A l'état normal, l'absorption active de Na⁺ se fait selon les mêmes modalités que celles décrites pour le modèle isotonique. En revanche, l'absorption de Cl se ferait par l'intermédiaire du canal CFTR. Cette absorption de NaCl, non accompagnée d'une absorption proportionnelle d'eau, rendrait le liquide de surface hypotonique. Chez les patients CF, l'épithélium respiratoire serait imperméable aux ions chlore, le sodium ne pouvant être absorbé rendrait ainsi le liquide présent à la surface de l'épithélium respiratoire hypertonique.

IV.1.2. Dérégulation des mouvements d'eau : le modèle isotonique

La seconde hypothèse suggère que le volume du liquide des voies aériennes est le résultat d'un équilibre entre la quantité de fluide sécrété et la quantité de fluide absorbé (Boucher, 2004). Selon les auteurs, les anomalies de la protéine CFTR induisent des modifications dans la régulation de la quantité de fluide sur l'épithélium respiratoire (Figure 25b). Par ailleurs, une augmentation de l'absorption de Na⁺ par le canal ENaC induirait une augmentation de l'absorption du liquide. La combinaison de ces effets induit une forte diminution de la hauteur du liquide sur l'épithélium respiratoire et une augmentation de la viscosité qui va modifier la clairance mucociliaire. Selon cette hypothèse, le liquide des voies aériennes est moins hydraté mais les concentrations en NaCl sont équivalentes entre les patients CF et non-CF. Pour vérifier cette hypothèse, l'équipe de Boucher, a mesuré le volume de fluide absorbé, la clairance et la composition ionique, sur des cultures de cellules épithéliales issues de prélèvements bronchiques CF et non-CF. La différence entre ces 2 cultures est observée au niveau de l'absorption du fluide alors que les autres paramètres n'étaient pas significativement différents (Matsui *et al.*, 2000).

IV.2. Infections dans la mucoviscidose

La susceptibilité des patients mucoviscidosiques aux infections bactériennes des voies respiratoires a été décrite dès la caractérisation de cette maladie. La mucoviscidose possède un spectre unique de pathogènes bactériens qui sont fréquemment acquis en fonction de l'âge des patients. Parmi les microorganismes causant des infections dans la mucoviscidose, seul *S*.

aureus appartient à la flore commensale et peut s'avérer pathogène chez des patients immunocompétents. *P. aeruginosa, Burkholderia cepacia (B. cepacia), H. influenzae, Stenotrophomonas maltophilia* et *Achromobacter xylosoxidans* sont considérés comme des pathogènes opportunistes (Figure 26) (Goss et Burns, 2007). D'autres microorganismes généralement non pathogènes pour l'organisme hôte sain peuvent être retrouvés dans la mucoviscidose, comme *Aspergillus* et les mycobactéries non tuberculeuses. Cependant, les infections dans les premières années de vie sont essentiellement dues à *S. aureus* et *H. influenzae* qui sont remplacés progressivement au cours des années par *P. aeruginosa*.



Figure 26. Prévalence bactérienne en fonction de l'âge (d'après Goss et Burns, 2007).

Pourcentage de patients mucoviscidosiques présentants des infections aux bactéries suivantes (tous âges confondus) : P. aeruginosa (ligne rouge) 57,3%; S. aureus (ligne verte) 51,7%; H. influenzae (ligne bleue) 16,2%; S. maltophilia (ligne jaune) 11,6%; B. cepacia (ligne noire) 2,9%; S. aureus résistant à la méticilline (ligne violette) 14,6%.

Avant les avancées obtenues en matière d'antibiothérapie et de nutrition, la mortalité des patients mucoviscidosiques était due aux infections respiratoires à *S. aureus* et aux problèmes de nutrition. Actuellement, l'espérance de vie a augmenté et la mortalité est principalement due aux infections respiratoires à *P. aeruginosa*. Une antibiothérapie agressive est utilisée dans le traitement des infections chez les patients mucoviscidosiques, ce qui a permis le contrôle des infections respiratoires à *S. aureus* et *H. influenzae*. En revanche, cette antibiothérapie agressive a abouti à l'adaptation à l'environnement bronchique et à l'apparition de la résistance aux antibiotiques de souches de *P. aeruginosa* initialement sensibles, qui peuvent ainsi devenir des variants mucoïdes. Des souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline ont été également isolées des poumons de patients atteints de la

mucoviscidose à hauteur de 14,6 % selon la Fondation Américaine de la mucoviscidose (US CF Foundation) (Goss et Burns, 2007). Des études récentes suggèrent que *S. aureus* aurait un rôle dans l'infection respiratoire à *P. aeruginosa* des patients CF, puisque *S. aureus* présente une source de fer pour la croissance de *P. aeruginosa* lors de co-cultures *in vivo* (Mashburn *et al.*, 2005).

L'infection chronique à *P. aeruginosa* observée dans la mucoviscidose est liée à la croissance de cette bactérie au niveau du mucus. Dans la mucoviscidose, on retrouve un mucus très épais qui génère un gradient d'oxygène qui va favoriser la formation d'alginate par *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* va alors croître dans un environnement restreint en oxygène et former des macrocolonies qui vont permettre une infection chronique (Figure 27) (Worlitzsch *et al.*, 2002).





Epithélium respiratoire normal b) Perte excessive du liquide de surface c) Hypersécrétion persistante de mucus d) Pénétration de la bactérie dans une atmosphère hypoxique e) Adaptation de P. aeruginosa aux niches en hypoxie via la formation d'alginate et l'augmentation de la densité des macrocolonies f) Résistance des macrocolonies aux défenses secondaires telles que l'afflux de neutrophiles qui favorise l'infection chronique.

La déficience en CFTR semble jouer également un rôle important dans l'infection persistante des voies respiratoires par *P. aeruginosa*. Les cellules épithéliales mucoviscidosiques permettent une adhérence plus importante de *P. aeruginosa* que les

cellules épithéliales normales (DiMango et al., 1998). Pier et al. ont proposé que la protéine CFTR est un récepteur de différents pathogènes dont P. aeruginosa (Pier et al., 1996; Pier et al., 1997). En revanche, Plotkowski et al. ont montré que l'internalisation de P. aeruginosa ne dépend pas de CFTR mais plutôt de la polarité cellulaire et de l'intégrité des complexes jonctionnels (Plotkowski et al., 1999). De plus, l'appareil respiratoire mucoviscidosique est un milieu propice à la prolifération bactérienne à cause de l'inhibition par les fortes concentrations de sels des molécules antimicrobiennes. S. aureus, le premier pathogène isolé dans le tractus respiratoire des enfants atteints de la mucoviscidose, adhère en priorité aux composants du mucus de l'épithélium respiratoire, cette adhérence est identique sur les épithéliums CF et non-CF (Ulrich et al., 1998). Cependant, l'adhérence de souches de S. aureus isolées de patients CF est plus élevée que celle de souches isolées de patients non-CF sur des cellules épithéliales bronchiques (Schwab et al., 1993). Jarry et Cheung ont récemment montré qu'après 1h d'invasion, S. aureus est internalisé dans les vésicules, ayant les caractéristiques des endosomes, des cellules épithéliales respiratoires normales et mucoviscidosiques. Cependant, 4h post-invasion, S. aureus se retrouve libre dans le cytosol des cellules épithéliales mucoviscidosiques alors que dans les cellules épithéliales normales, S. aureus reste dans l'endosome, ce qui inhibe sa réplication et entraîne sa destruction progressive par le contenu de l'endosome. Ces travaux suggèrent que la mutation $\Delta F508$ de CFTR est associée à un défaut dans la capacité des cellules épithéliales à contrôler la sortie de l'endosome et leur échec dans la dégradation de S. aureus internalisé, permettant ainsi une réplication bactérienne intracellulaire et des lésions tissulaires conséquentes (Jarry et Cheung, 2006).

IV.3. Inflammation pulmonaire dans la mucoviscidose

L'atteinte bronchopulmonaire, caractérisée par une infection et une inflammation est la principale cause de morbidité et de mortalité chez les patients atteints de la mucoviscidose (Heijerman, 2005). Cependant, il est encore mal défini si l'infection est la cause ou la conséquence de l'inflammation (Dakin *et al.*, 2002). Bien que les avis sur ce sujet soient très controversés (Becker *et al.*, 2004 ; Armstrong *et al.*, 2005), il semblerait que l'inflammation précède l'infection (Tirouvanziam *et al.*, 2000 ; Hubeau *et al.*, 2001b ; Carrabino *et al.*, 2006). Une étude récente chez la souris a montré que la surexpression des canaux ENaC entraîne une réabsorption du liquide de surface aboutissant à un phénotype CF-like. Cette surexpression est accompagnée d'un recrutement de neutrophiles et d'une augmentation des secrétions des

protéines inflammatoires (MIP-2 et analogue murin de l'IL-8) en dehors de toute infection (Mall *et al.*, 2004). Ces résultats supportent l'hypothèse que l'inflammation peut être due à un défaut du transport ionique avant toute infection.

IV.3.1. Les chimiokines

L'IL-8, la chimiokine la plus étudiée dans la mucoviscidose, est utilisée comme un marqueur d'inflammation. L'augmentation de l'IL-8 dans le lavage bronchoalvéolaire de patients CF a été observée pour la première fois en 1992 (McElvaney et al., 1992). Ensuite une série d'études a montré un taux élevé de cette chimiokine dans la CF (Machen, 2006). Par exemple, Kammouni et al ont montré qu'à l'état basal, les cellules séreuses glandulaires de trachée humaine mucoviscidosique secrètent les cytokines IL-6 et IL-8 en quantité significativement plus importantes que les cellules non-CF (Kammouni et al., 1997). Il a été également montré que les LBA de patients CF contiennent des quantités plus élevées d'IL-8, MCP-1 et MIG que les LBA de sujets contrôles (Hartl et al., 2006). Quelques études contradictoires ne montrent pas de différence significative du taux de l'IL-8 entre cellules épithéliales CF et non-CF (Becker et al., 2004; Reiniger et al., 2005; Wiszniewski et al., 2006), voire même un taux d'IL-8 sécrétée par les cellules CF inférieur à celui des cellules non-CF (Massengale et al., 1999). Il a été également décrit que les LBA de patients CF et non-CF présentaient des quantités équivalentes de GROa (Wyatt et al., 2000). Les LBA de patients CF infectés par P. aeruginosa contiennent des quantités plus élevées d'IL-8, MCP-1 et MIG que les LBA de patients CF non infectés par P. aeruginosa ou de sujets non-CF (Hartl et al., 2006). Reiniger et al., ont montré que l'infection des cellules épithéliales bronchiques CF par *P. aeruginosa* n'avait pas d'effet sur la sécrétion d'IL-8 et de GROα. Par contre cette infection augmentait la production d'IL-8 et de GROa par les cellules épithéliales bronchiques non-CF (Reiniger et al., 2005). Les données de la littérature concernant la sécrétion des chimiokines par les cellules épithéliales bronchiques CF en absence ou en présence d'infection restent cependant très controversées. De plus, à ce jour, l'infection par P. aeruginosa dans la mucoviscidose a été largement étudiée contrairement aux infections par S. aureus qui restent très peu explorées.

IV.3.2. Les lymphocytes T dans la mucoviscidose

Les lymphocytes T représentent les cellules immunitaires les plus nombreuses (48% des cellules quantifiées) dans la muqueuse et la sous-muqueuse des voies aériennes CF et non-CF (Hubeau *et al.*, 2001a). Dans la muqueuse bronchique de patients CF, le nombre de lymphocytes T est plus élevé par rapport aux sujets sains (Azzawi *et al.*, 1992). Plusieurs études ont montré qu'au niveau des voies aériennes supérieures, le nombre de lymphocytes T et de mastocytes est augmenté, tandis que le nombre de granulocytes est réduit (Lesprit *et al.*, 2000 ; Henderson et Chi, 1992). Un nombre accru de lymphocytes T est également observé au niveau distal où l'épithélium est sévèrement lésé (Hubeau *et al.*, 2001a). Si l'on observe plus de LT dans l'ensemble de la muqueuse bronchique, c'est au niveau alvéolaire que leur nombre est directement corrélé à une diminution de la fonction respiratoire (Kraft *et al.*, 1999). Le recrutement de nombreux lymphocytes T dans les voies aériennes de patients CF reste encore inexpliqué.

Dans la mucoviscidose, les lymphocytes circulants de jeunes patients CF produisent des quantités anormalement élevées d'IL-2 (cytokine Th1), et des quantités similaires d'IL-10 (cytokine Th2) en comparaison avec leurs productions par les LT de donneurs sains (Hubeau et al., 2004). Les LT de patients chroniquement infectés par P. aeruginosa produisent plus d'IL-4 et moins d'IFN- γ que les LT de patients non-infectés, suggérant une prédominance de réponse Th2 chez ces patients (Brazova et al., 2005; Moser et al., 2005). Néanmoins, la prédominance Th2 corrèle négativement avec une bonne fonction respiratoire. D'autres études ont également mis en évidence cette prédominance Th2 dans les LBA de patients ayant une infection chronique à P. aeruginosa. En effet, le nombre de LT Th2 CCR4⁺ est augmenté dans les LBA de patients CF infectés par P. aeruginosa comparativement aux LBA de patients CF non-infectés et de contrôles sains. Cette augmentation est associée à des taux élevés de cytokines Th2 comme l'IL-4, l'IL-13, TARC et MDC dans le LBA (Hartl et al., 2006). Cependant, le nombre de LT Th1 CXCR3⁺ dans les LBA des différents groupes de patients était identique. Une prévalence des maladies de type Th2, telles que l'aspergillose bronchopulmonaire allergique est observée dans la mucoviscidose. Les LT prolifèrent en réponse aux antigènes des organismes qui colonisent les poumons des patients CF tels que P. aeruginosa et A. fumigatus (Casaulta et al., 2003; Lahat et al., 1989). Bien que les évidences supportent la notion que la mucoviscidose est une maladie de prédominance Th2, la neutrophilie pulmonaire reste inexpliquée. Il a été récemment montré que l'IL-17, sécrétée par les Th17, régule le recrutement des neutrophiles via l'induction des chimiokines et la régulation de

l'expression de G-CSF. Des taux élevés d'IL-17 et d'IL-23 sont retrouvés dans les crachats de patients CF présentant une exacerbation pulmonaire (Dubin *et al.*, 2007). Dans un modèle murin d'infection respiratoire à *P. aeruginosa*, il a aussi été montré que le recrutement des neutrophiles est dépendant de l'IL-23/IL-17. Ceci suggère que la mucoviscidose pourrait être une maladie de prédominance Th17.

PARTIE EXPERIMENTALE

OBJECTIFS

La mucoviscidose (CF) est une maladie génétique autosomale récessive, due à une mutation du gène codant la protéine CFTR. La principale cause de morbidité et de mortalité des patients atteints de la mucoviscidose est l'inflammation respiratoire chronique due aux infections. *S. aureus*, une bactérie commensale de l'épithélium nasal, est un des premiers pathogènes qui colonisent l'appareil respiratoire des patients mucoviscidosiques. *S. aureus* précède généralement la colonisation de l'épithélium respiratoire par *P. aeruginosa*.

La défense innée de l'épithélium respiratoire vis à vis des infections bactériennes impliquent à la fois l'intégrité et la polarité cellulaire, les facteurs de défense sécrétés par les cellules épithéliales et les cellules immunes. *S. aureus* est retrouvé de façon précoce et chronique chez les personnes atteintes de mucoviscidose (CF). Chez ces personnes CF de nombreuses cellules immunes s'accumulent dans des régions pulmonaires où l'épithélium est sévèrement lésé, en particulier les lymphocytes T (LT) au niveau des bronches distales. Cependant, le rôle spécifique joué par *S. aureus* dans la réponse inflammatoire des cellules épithéliales, dans l'accumulation des LT et dans la progression de la mucoviscidose reste encore très peu étudié.

Le but de ce travail était de comprendre et d'étudier le rôle de *S. aureus*, lors d'une infection précoce, dans la sécrétion de chimiokines par les cellules épithéliales respiratoires normales et mucoviscidosiques et le chimiotactisme des LT primaires issus de patients CF ou de donneurs sains.

Les lignées cellulaires utilisées dans ce travail sont la lignée MM-39 (non-CF) et la lignée KM-4 (CF). Ces cellules ont été développées dans le laboratoire du Pr. Figarella C à Marseille (Kammouni *et al.*, 1999 ; Merten *et al.*, 1996) à partir de cultures primaires provenant de bronches de donneurs et receveurs au cours de transplantations bi-pulmonaires. La lignée MM-39 exprime fortement le CFTR alors que la lignée KM-4 est homozygote pour la mutation Δ F508. Ces cellules ont été transformées avec une souche sauvage du virus SV40 et ont conservé une sécrétion constitutive et régulée de protéines sécrétées spécifiques des glandes séreuses (lysozyme, lactoferrine, défensine et SLPI), caractéristiques des cellules épithéliales sécrétoires primaires. Les LT utilisés dans la première étude proviennent de poches de sang de donneurs sains enrichies en lymphocytes après élutriation. Dans la deuxième étude, les LT provenaient de patients CF et de donneurs sains après prélèvement de sang total. Après séparation des cellules mononucléaires sur gradient de densité, les LT ont été purifiés par tri magnétique.

Nous avons, dans un premier temps, analysé l'interaction de *S. aureus* avec les cellules épithéliales glandulaires bronchiques normales dans un modèle en double chambre. Nous avons étudié plus particulièrement l'effet de *S. aureus* sur la production apicale et basolatérale de chimiokines par les cellules épithéliales glandulaires bronchiques et le chimiotactisme des LT primaires de donneurs sains vis-à-vis des surnageants apicaux et basolatéraux de culture de ces cellules. Nous avons ensuite analysé le rôle de l'IL-8 dans le chimiotactisme des LT, et enfin l'expression des récepteurs des chimiokines sur les LT après contact avec les surnageants de culture des cellules épithéliales glandulaires bronchiques.

Dans un deuxième temps, nous avons analysé l'interaction de *S. aureus* avec les cellules épithéliales glandulaires bronchiques CF, dans notre modèle en double chambre. Nous avons étudié plus particulièrement l'effet de *S. aureus* sur la production apicale et basolatérale de chimiokines par les cellules épithéliales glandulaires bronchiques non-CF et CF et le chimiotactisme des LT primaires de patients CF et de donneurs sains vis-à-vis des surnageants apicaux et basolatéraux de culture de ces cellules. Nous avons ensuite analysé le rôle de l'IL-8 dans le chimiotactisme des LT, et enfin l'expression différentielle des récepteurs des chimiokines sur les LT non-CF et CF.

RESULTATS

ARTICLE 1

T cell chemotaxis and chemokine release after *Staphylococcus aureus* interaction with polarized airway epithelium

Escotte S., Al Alam D., Le Naour R., Puchelle E., Guenounou M., Gangloff S.C.

Am J Respir Cell Mol Biol. 2006 Mar;34(3):348-54.

ARTICLE 1

Chimiotactisme des lymphocytes T et sécrétion de chimiokines après interaction de *Staphylococcus aureus* avec des cellules épithéliales respiratoires polarisées.

L'épithélium respiratoire joue un rôle fondamental dans la défense de la muqueuse respiratoire contre les agents pathogènes. En effet, les cellules épithéliales sont activement impliquées dans la défense immunitaire et l'inflammation respiratoire, *via* la sécrétion de médiateurs inflammatoires tels que les cytokines et les chimiokines permettant le recrutement de cellules immunitaires (Diamond *et al.*, 2000). Chez l'homme, différentes études ont montré une augmentation de la sécrétion d'IL-8, RANTES, éotaxine et IP-10 suite aux infections (Larsson *et al.*, 1999 ; Rose *et al.*, 2002 ; Message et Johnston, 2004 ; Kawaguchi *et al.*, 2000 ; Tekkanat *et al.*, 2002 ; Spurrell *et al.*, 2005). Or, ces quatre chimiokines possèdent un pouvoir chimioattractant sur les LT (Baggiolini, 2001) régulé par la présence et l'expression des récepteurs de ces chimiokines sur les LT (Luster, 1998).

S. aureus est un pathogène majeur impliqué dans les infections respiratoires nosocomiales et dans celles associées à certaines pathologies comme la mucoviscidose. Il a été montré que *S. aureus*, au contact de l'épithélium respiratoire, induit l'apoptose des cellules épithéliales, la sécrétion d'agents antimicrobiens et de médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL-8 et l'IL-6, la stimulation des LT *via* les superantigènes et l'accumulation des PNN au niveau du site infectieux (Llewelyn et Cohen, 2002). Néanmoins, les conséquences de l'interaction de *S. aureus* lors de l'infection de cellules épithéliales bronchiques polarisées sur la sécrétion de chimiokines par ces mêmes cellules et le recrutement des LT sur le site infectieux restent très mal définies.

Dans cette étude, nous avons développé un modèle de culture en double chambre pour analyser :

- La sécrétion des chimiokines (IL-8, RANTES, éotaxine et IP-10) dans les surnageants de culture apicaux et basolatéraux des cellules épithéliales stimulées ou non par S. aureus
- Le chimiotactisme des LT primaires de donneurs sains (CD3⁺, CD4⁺ et CD8⁺) vis-àvis de ces mêmes surnageants
- L'expression des récepteurs des chimiokines (CXCR1, CXCR3 et CCR3) sur les LT primaires après contact avec les différents surnageants.

T Cell Chemotaxis and Chemokine Release after Staphylococcus aureus Interaction with Polarized Airway Epithelium

Sandie Escotte, Denise Al Alam, Richard Le Naour, Edith Puchelle, Moncef Guenounou, and Sophie C. Gangloff

Laboratoire d'Immuno-Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire, EA3796, Université de Reims Champagne Ardennes, IFR53; and INSERM UMRS 514, IFR 53, Reims, France

In response to bacterial infection, airway epithelium releases inflammatory mediators including cytokines and chemokines that lead to immune cell efflux and could stimulate the adaptive T cell immune response. The aim of our study was to analyze, in a double chamber culture, the chemokine changes in response to *Staphylococcus aureus* and their consequences for T cells. Our data show that *S. aureus* stimulates basolateral and apical release of IL-8 and eotaxin by airway epithelial cells. We also observed increased chemokine receptor expression on CD8⁺ and CD4⁺ T cells and enhanced chemotaxis of CD4⁺ T cells toward apical supernatant. Our data strongly suggest that *S. aureus* interaction with airway epithelium contributes to specific migration of T cells to inflamed sites.

Keywords: airway epithelial cells; chemokines; chemotaxis; *Staphylococcus aureus*; T lymphocytes

Airway epithelium, which is exposed to many inhaled particles, is a mechanical barrier that separates the submucosal environment from the lumen milieu. Airway epithelial cells are actively involved in the innate and acquired immune response and in the pathogenesis of airway inflammation. In response to bacterial infection, airway epithelium releases a broad spectrum of factors, including antibacterial factors, cytokines, and chemokines, that modulate the inflammatory response (1). Chemokines and their receptors are important factors underlying the mechanisms regulating the tissue-specific immune cell recruitment. Several chemokines are produced either constitutively or in the setting of airway inflammation. In humans, several airway infection studies have reported increased expression of IL-8 (2, 3), eotaxin (4, 5), regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) (6) and IFN- γ -inducible protein-10 (IP-10) (7). The CXC chemokines IL-8 and IP-10 are chemotactic for neutrophils, monocytes, and T lymphocytes. Eotaxin and RANTES, CC chemokines, are also chemotactic for inflammatory cells like eosinophils, basophils, mast cells, monocytes, and lymphocytes (8). Furthermore, selective homing and/or preferential accumulation of these effector cells are also regulated by the expression of a specific chemokine receptor pattern on their surface (9–11).

T cells are critical adaptative mediators in inflammatory diseases, endowed with the capacity to initiate, amplify, and terminate antigen-specific immune responses. They are a highly heterogeneous population that shows complex patterns of traf-

Am J Respir Cell Mol Biol Vol 34. pp 348-354, 2006

ficking (e.g., presence of specific CD4⁺ or CD8⁺ T cell subsets in the infectious environment) (12, 13). Type 1 and type 2 T cells can be functionally identified among the CD4⁺ and CD8⁺ T cells on the basis of their cytokine pattern and their chemokine receptor pattern (14). A number of pulmonary diseases are characterized by preferential accumulation of type 1 or type 2 T cells, which specifically modulate defined aspects of pathogenesis in affected tissues (15, 16). For example, T cells infiltrating the airway of patients with chronic obstructive pulmonary disease and pulmonary sarcoidosis were shown to have a type 1 profile and to express high levels of CXCR3, the IP-10 receptor (17). T cells isolated from asthmatic human bronchoalveolar lavage fluid were found to have a type 2 profile and to express preferentially CCR5 and CXCR3, the receptors for RANTES and IP-10, respectively (18). The selective recruitment of type 1 or type 2 T cells into the lung is therefore a critical event for the development of the pathogenesis of airway inflammatory diseases.

Staphylococcus aureus, classically considered as an extracellular pyogenic pathogen that can persist in epithelia, is one of the first pathogens to colonize the respiratory tract. *S. aureus* infections are common in patients with compromised airway defense as in cystic fibrosis (CF) or nosocomial pulmonary infection. Upon interaction with the epithelium, the bacterium is known to induce antimicrobial activity (19), cell apoptosis (20), production of proinflammatory mediators like IL-8 and IL-6 (21), and to stimulate T cell activation via superantigen (22). Also, the host response to *S. aureus* is dominated by polymorphonuclear leukocytes (PMN). However, little is known about the consequences of the early airway epithelium–*S. aureus* interaction for T cell mobilization and polarization.

In the present study, we used a polarized human MM-39 tracheal cell model retaining serous secretory functions to study the effects of live S. aureus on respiratory epithelium and the consequences for circulating T cells. Our data show that S. aureus stimulates significantly apical and/or basolateral release of IL-8, eotaxin, and RANTES by airway epithelial cells. Moreover, we demonstrate that S. aureus interaction with airway epithelial cells also induces a specific chemokine receptor pattern on the T cell subpopulation and an enhanced chemotaxis of CD4⁺ T cells toward apical airway epithelial cell supernatant. CD4⁺ T cells exhibited increased expression of the IL-8 and IP-10 receptors, while CD8⁺ T cells showed increased expression of the IL-8 and eotaxin/RANTES receptors. Taken together, our data suggest that after 3 h interaction with airway epithelium, live S. aureus induces significant changes in both apical and basolateral cell secretions, leading to specific T cell accumulation at the inflamed site.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strain and Growth Conditions

S. aureus strain 8325-4, a wild-type laboratory strain (NCTC 8325 cured of prophages), was a generous gift from T. J. Foster (Department of

⁽Received in original form May 18, 2005 and in final form September 13, 2005)

This work was supported by Association Vaincre la Mucoviscdose (AVLM). E.S. and A.D. are supported by AVLM.

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Prof. S. C. Gangloff, Laboratoire d'Immuno-pharmacologie cellulaire et moléculaire, EA3796-IFR53, 1 Avenue du Maréchal Juin, 51100 Reims, France. E-mail: sophie. gangloff@univ-reims.fr

Originally Published in Press as DOI: 10.1165/rcmb.2005-0191OC on November 11, 2005 Internet address: www.atsjournals.org

Microbiology, Trinity College, Dublin, Ireland). Bacteria were stored at -20° C in trypticase soy broth (TSB-bioMérieux S.A., Marcy l'Etoile, France) containing 20% (vol/vol) glycerol. Before each assay, bacteria were cultured in trypticase soy broth (TSB) at 37°C with shaking up to stationary growth phase. An aliquot of the culture was then inoculated into fresh TSB at a starting OD_{$\lambda=600nm$} = 0.1 and cultured at 37°C up to an OD_{$\lambda=600nm$} = 0.6. In these conditions, bacteria used for the interaction with epithelial cells were in their exponential growth phase.

Airway Epithelial Cell Culture and Interaction with S. aureus

A transformed human tracheal gland cell line MM-39, developed by M. Merten (EMI 0014 Inserm, Vandoeuvre-les-Nancy, France), was cultured as previously described (23). Briefly, cells were grown at 37°C under 5% CO2 atmosphere on type I collagen-coated flasks in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) F-12 mixture (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 1% Ultroser G serum substitute (Biosepra, Villeneuve La Garenne, France), glucose (10 g/liter), sodium pyruvate (0.33 g/liter), penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100 µg/ml), and amphotericin B (2 µg/ml). Polarized monolayers of MM-39 were prepared by seeding 5×10^5 cells/cm² on a Transwell (3 µm, 1.1-cm², polyester; Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) (Figure 1A). The cells were maintained at 37°C under 5% CO₂ atmosphere, in a liquid:liquid system with 500 µl supplemented DMEM F-12 in the apical compartment and 700 µl supplemented DMEM F-12 in the basolateral compartment. After 8-10 d of culture, airway epithelial cells were confluent (Figure 1B), and the formation of tight junctions was functionally assessed by measurements of the electrical resistance across monolayers. The uninfected monolayer steady-state resistance of 300 Ω/cm^2 was reached in 8–9 d. Airway epithelial cells showed a glandular serous type with a polarized secretory leukoprotease inhibitor (SLPI) secretion (a serous cell-specific secretory marker) (Figure 1C). Twelve hours before the interaction with bacteria, the cell culture media were replaced with fresh DMEM F-12 medium, and the media were changed once again just before the experiment. For each experiment, cultures were apically infected with live S. aureus, at a ratio of 30 bacteria for 1 epithelial cell (3.3×10^7 cfu/ml), for 3 h. Epithelial integrity was confirmed by the measurement of the transepithelial resistance, which remained constant through the 3 h of interaction. At the end of the interaction, the apical (500 µl) and the basolateral (700 µl) supernatants were collected. To obtain cell-free supernatants and to normalize the volume of the apical versus basolateral superna-



Figure 1. Airway epithelial cell double chamber culture model. (*A*) Airway epithelial cells were grown on the upper side of porous polycarbonate filters coated with collagen I. (*B*) Confluent airway epithelial cells (MM-39) (transversal section and phase-contrast microscopy) after 10 d of culture. (*C*) Apical and basolateral secretion of SLPI, a serous glandular cell-specific marker. *Bar*, 10 μ m. *Original magnification*: ×400, ****P* < 0.001 compared with basolateral supernatants.

tant, 200 μ l DMEM F-12 were added to the apical supernatant; the supernatants were then centrifuged (10,000 rpm, 10 min, 4°C) and passed through a 0.45- μ m membrane filter (Millipore, Molsheim, France).

Isolation and Culture of Human Peripheral Blood Lymphocytes

Enriched human peripheral blood lymphocyte preparations from healthy consenting donors, after protocol approval by the Ethics Committee of the CHU de Reims, were obtained by counter-courant elutriation (Department of Haematology, CHU de Reims). Lymphocytes were prepared by standard density gradient centrifugation (Lymphoprep, Abcys, Paris, France). T cell subsets were purified by immunomagnetic negative selection using the pan T cell biotin-antibody cocktail and the human anti-CD4 and anti-CD8 mAb (microbeads MACS; Miltenyi, Paris, France). Purity of CD3⁺ lymphocyte, CD4⁺ T lymphocyte, and CD8⁺ T lymphocyte preparations was in the range of 81.1-99.5%, as assessed by flow cytometry with human CD19, CD3, CD8, and CD4 monoclonal antibody (mAb) (BD Biosciences, San Diego, CA). Lymphocytes were cultured in RPMI 1640 (Invitrogen) containing L-glutamine (2 mM), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), and 10% filtered heat-inactivated FCS (Invitrogen) and resuspended at a concentration of 1×10^6 cells/ml.

Chemotaxis Assay

Experiments were performed on the 1.1-cm², 3- μ m pore size polyester filters (Becton Dickinson Labware). Purified T lymphocytes (6.10⁴ cells) were resuspended in DMEM F-12 and loaded in the upper chamber. Different airway epithelial cell supernatants (AECS) were loaded in the lower chamber. After 24 h incubation at 37°C under 5% CO₂, T cells present in the lower chamber were counted. To compare the results from different experiments, a chemotaxis index (CI = number of T cells migrating toward the epithelium supernatant/number of T cells migrating toward control media) was calculated. The number of cells represents the mean of five high-power fields for each condition. The results are reported as the mean CI ± SEM of at least three independent experiments.

For the neutralizing IL-8 chemotaxis assay, the epithelial cell supernatants were preincubated with anti–IL-8 antibodies (R&D Systems, Lille, France). Enough antibody was used to inhibit responses to 10 times more human recombinant IL-8 than the quantity of IL-8 found in the different epithelial supernatants (Table 1).

Chemotaxis experiments on solidified 2% agarose (Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO) 35-mm Petri dishes (5 ml/well) were also performed. Briefly, three equidistant 3-mm holes were punched in the agarose. Subsequently, the lymphocytes (1.10^6 cells) were loaded in the center hole and the cell culture supernatants or control media were added to each side hole. Petri dishes were incubated at 37°C in a humid chamber for 24 h, then fixed with a paraformaldehyde solution (4% in PBS), rinsed, and air dried. The distances were measured between the center of the hole and the edge of the rocket formed by the lymphocytes migrating toward cell supernatant (distance toward supernatant or DTS) or toward control media (distance chemotaxis index (DCI = DTS/DTM) was then calculated. The results are reported as the mean DCI \pm SEM of at least six independent experiments.

Flow Cytometric Analysis

Reagents were from Becton Dickinson (CD19-FITC, CD3-PE, CD4-FITC, CD8-FITC, CXCR1-biotin, Streptavidin-PerCp, CXCR3-PE, and CCR3-PE). Enriched peripheral blood lymphocytes were stained according to the manufacturer's specifications for analysis by flow cytometry. For each sample, 0.5–1.10⁶ cells were stained; comparable numbers of cells were used for each independent test. All data were obtained on FACScalibur and analyzed with CellQuest software (Becton Dickinson, San Jose, CA). At least 10,000 gated events were evaluated for each condition. Appropriate mAb isotypic controls were included in each analysis, with acquisition and analysis gates set accordingly.

ELISA of SLPI, IL-8, IP-10, Eotaxin, and RANTES

SLPI, IL-8, IP-10, eotaxin, and RANTES in airway epithelial cell culture supernatants were quantified by ELISA (Duoset and Quantikine; R&D

TABLE 1. LYMPHOCYTE CHEMOTAXIS INDEX IN RESPONSE TO IL-8

Rh IL-8 pg/ml	Chemotaxis Index CD4+		Chemotaxis Index CD8+	
	Anti–IL-8 0 μg/ml	Anti–IL-8 1 μg/ml	Anti–IL-8 0 μg/ml	Anti–IL-8 1 μg/ml
0	1 ± 0.0	1 ± 0.0	1 ± 0.0	1 ± 0.0
5	5.9 ± 4.3	3.2 ± 2.3*	1.3 ± 0.7	$0.7 \pm 0.3*$
50	5.5 ± 2.3	$0.9 \pm 0.2*$	2.0 ± 0.3	$0.8 \pm 0.2^{*}$
500	5.8 ± 2.3	1.9 ± 0.7*	2.6 ± 0.6	$0.8 \pm 0.1*$
5,000	5.1 ± 2.1	$1.1 \pm 0.6^{*}$	2.8 ± 0.3	$0.9 \pm 0.3^{*}$
50,000	9.7 ± 4.7	4.7 ± 3	2.7 ± 0.8	0.7 ± 0.5

The chemotaxis indices of the CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes towards recombinant human IL-8 (rh IL-8) were calculated in the absence and presence of neutralizing IL-8 antibodies at a concentration of 1 μ g/ml (n = 3, independent experiments, data are the mean \pm SEM). Migration toward culture medium reflects passive migration. * *P* < 0.05.

Systems) following the manufacturer's instructions. The detection limit of each ELISA was 25 pg/ml, 25 pg/ml, 5 pg/ml, 1 pg/ml, and 1 pg/ml for SLPI, IL-8, IP-10, eotaxin, and RANTES, respectively.

Statistical Analysis

All data are presented as means \pm SEM of at least three independent experiments. Statistical significance was determined by ANOVA (Stat-View Software, Cary, NC).

RESULTS

S. aureus Induces Polarized Secretion of Chemokines by **Airway Epithelial Cells**

To determine whether apical S. aureus interaction with polarized airway MM-39 epithelial cells induces the secretion of chemokines, the levels of IL-8, RANTES, eotaxin, and IP-10 were measured, by ELISA, in apical and basolateral AECS. In the absence of S. aureus, significant differences were observed in the apical supernatant versus basolateral supernatant (317.2 \pm 96.8 pg/ml and 197.8 \pm 81.6 pg/ml for IL-8 [P < 0.05]; 10.5 \pm 4.0 pg/ml and 4.1 \pm 2.5 pg/ml for RANTES, respectively). IP-10 release was similar in apical and basolateral AECS (19.2 \pm 7.7 pg/ml versus 11.3 ± 4.5 pg/ml, respectively). Under our experimental conditions, eotaxin release was not detected (Figure 3). Exposure of epithelial cells to S. aureus resulted in drastic changes. IL-8 release increased significantly in both apical and basolateral supernatants (5.2-fold, P < 0.01; 2.6-fold, P < 0.05, respectively) as compared with control AECS. A significant in-



Figure 2. Qualitative underagarose chemotaxis assay. Lymphocytes were loaded in the center hole (black circle). After 24 h, migration occurred toward apical supernatants of S. aureus-stimulated airway epithelial cells. The distances were measured between the center of the hole and the edge of the rocket formed by the lymphocytes migrating toward cell supernatants (DTS) or toward culture medium (DTM). Lymphocyte distance chemotaxis index (DCI = DTS/DTM) was then calculated.

crease of eotaxin in both supernatants (P < 0.01) was observed. In contrast, no significant changes in IP-10 and RANTES were observed after addition of S. aureus (Figure 3).

S. aureus Interaction with Polarized Airway Epithelial Cells Enhances T Lymphocyte Chemotaxis

To test whether supernatants from S. aureus-stimulated epithelial cells affect the chemotaxis of circulating T lymphocytes, quantitative and qualitative migratory assays were performed. As shown in Figure 4, T cell contact with apical AECS led to a higher lymphocyte migration than contact with basolateral AECS when epithelial cells were not stimulated (3.0-fold versus 1.7fold, respectively, compared with passive migration, P < 0.05)



Figure 3. Chemokine secretion by airway epithelial cells after apical S. aureus stimulation. Airway epithelial cells grown in the double chamber model were in contact with culture medium (-) or exposed to S. aureus (+). Apical (filled bars) and basolateral (open bars) cell culture supernatants were harvested after a 3-h interaction. IL-8, RANTES, eotaxin, and IP-10 were measured by ELISA. Results are the mean \pm SEM of at least three independent experiments. (*P < 0.05, **P < 0.01). ND: not detected, under the detection limit.



Figure 4. Lymphocyte migration toward supernatants of airway epithelial cells. Lymphocytes were incubated for 24 h with apical (*filled bars*) or basolateral (*open bars*) airway epithelial cell supernatant conditioned by the absence (–) or presence (+) of *S. aureus*. All data were expressed as a chemotaxis index (CI = number of T cells migrating toward the epithelium supernatant/number of T cells migrating toward control media). Results are the mean \pm SEM of three independent experiments. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 compared with culture medium.

or *S. aureus*-stimulated (5.2-fold versus 3.7-fold, respectively, compared with passive migration, P < 0.01). It is of note that *S. aureus*-stimulated AECS always induced greater lymphocyte chemotaxis than nonstimulated AECS (P < 0.01). These data were double confirmed with the underagarose chemotaxis assay (Table 2).

To determine which T lymphocyte subsets migrated in response to supernatants from S. aureus-stimulated epithelial cells, purified CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes were tested for chemotaxis. As shown in Figure 5A, in nonstimulated conditions, CD8⁺ T cell chemotaxis toward apical and basolateral supernatant was similar. CD4⁺ T cells migrated, however, preferentially toward the apical supernatant (2.7-fold for apical versus 1.5-fold for basolateral as compared with passive migration). After contact with S. aureus-stimulated AECS, the increase in the CD8+ T cell chemotaxis index (2.5-fold as compared with passive migration) was only observed when the cells were in contact with the apical supernatant. The CD4⁺ T cell chemotaxis was altered more, with impressive chemotaxis when these cells were in contact with the apical S. aureus-stimulated AECS (9.2-fold for stimulated versus 2.7-fold for nonstimulated) and to a lower extent when they were in contact with the basolateral S. aureusstimulated AECS (2-fold for stimulated versus 1.5-fold for nonstimulated). When the chemotaxis of the two populations was compared, CD4⁺ T cells always exhibited a higher chemotaxis index than did CD8⁺ T cells (P < 0.05).

TABLE 2. LYMPHOCYTE DISTANCE CHEMOTAXIS INDEX IN RESPONSE TO SUPERNATANTS OF *S. aureus*-STIMULATED AIRWAY CELLS

	Distance Chemotaxis Index (DCI)		
Medium Tested	Apical	Basolateral	
Nonstimulated	3.7 ± 0.56	1.0 ± 0.13	
S. aureus-stimulated	9.2 ± 2.61	1.6 ± 0.26	

The distances were measured between the center of the hole and the edge of the rocket formed by the lymphocytes migrating towards cell supernatants (DTS) or towards culture medium (DTM). Lymphocyte distance chemotaxis index (DCI = DTS/DTM) was then calculated (n = 6, independent experiments, data are the mean \pm SEM). Migration toward culture medium reflects passive migration.



Figure 5. T lymphocyte subset migration toward airway epithelial cell supernatants (A) and IL-8 involvement in T cell chemotaxis (B). (A) Apical supernatants of S. aureus-stimulated airway epithelial cells enhance chemotaxis of lymphocyte subsets. CD8+ (white bars) and CD4+ (gray bars) T cells were incubated for 24 h with airway apical or basolateral epithelial cell supernatant conditioned by the absence (-) or presence (+) of S. aureus. Data were expressed as a chemotaxis index. This index corresponds to the number of cells migrating toward supernatant/ number of cells migrating toward culture medium. (B) Neutralization of IL-8 inhibits the migration of CD8⁺ and CD4⁺ T cells toward apical or basolateral supernatants of S. aureus-stimulated airway epithelial cells. CD8⁺ (white bars) and CD4⁺ (gray bars) T cells were incubated for 24 h with apical or basolateral supernatants of S. aureus-stimulated airway epithelial cells in the absence (-) or presence (+) of 1 μ g/ml of IL-8 neutralizing antibody. Data were expressed as the percentage of the chemotaxis index. Results are the mean \pm SEM of four independent experiments (*P < 0.05).

The increased IL-8 production by epithelial cells and enhanced T cell migration after contact with *S. aureus*-stimulated AECS suggested that IL-8 is a major chemoattractant for T cells. Indeed, complete inhibition of IL-8 function by anti–IL-8 antibodies showed an important effect of IL-8 on chemotaxis of CD8⁺ and CD4⁺ T cells toward both apical and basolateral AECS (Figure 5B). For CD8⁺ T cells, chemotaxis inhibition represented 55% and 50% in the apical and basolateral supernatants, respectively. For CD4⁺ T cells, the inhibition represented 40% in the apical supernatant and up to 90% in the basolateral supernatant.

Regulation of CXCR1, CXCR3, and CCR3 on the CD8⁺ and CD4⁺ T Cell Subsets in Contact with Supernatants of *S. aureus*–Stimulated Airway Epithelial Cells

To examine further the effects of the changes in the *S. aureus*-conditioned AECS on T cells, expression of the chemokine



Figure 6. Chemokine receptor expression on T cell subsets. Apical (*A*) and basolateral (*B*) supernatants of *S. aureus*-stimulated airway epithelial cell upregulates the expression of CXCR1, CXCR3, and CCR3 on lymphocyte subsets. Flow cytometric analysis of lymphocyte subsets after contact with apical or basolateral supernatants of *S. aureus*-stimulated versus nonstimulated airway epithelial cell supernatants was done with control nonbinding anti-isotype antibody and human CXCR1, CXCR3, and CCR3 monoclonal antibody. Lymphocyte subsets were stimulated for 3 h at 37°C. *Dot plots* shown represent one of at least three independent experiments. For each profile, the *filled histogram* represents the control isotype, the *thin line* represents T cells in contact with supernatants of *S. aureus*-stimulated airway epithelial cell supernatants, and the *bold line* represents T cells in contact with supernatants of *S. aureus*-stimulated airway epithelial cells.

receptors CXCR1 (IL-8 receptor), CCR3 (RANTES and eotaxin receptor), and CXCR3 (IP-10 receptor) on the CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes was analyzed. As shown in Figure 6A, CD8⁺ and CD4⁺ T cells treated with apical nonstimulated AECS expressed CXCR1 as well as CXCR3 and CCR3 on their surfaces. These receptor expressions were enhanced when the T cells were in contact with apical *S. aureus*-stimulated AECS. The CXCR1 and CCR3 expressions were increased on CD8⁺ T cells, and the CXCR1 and CXCR3 expressions were increased on CD8⁺ T cells, and the CXCR1 and CXCR3 expressions were increased on CD4⁺ T cells. In contact with basolateral nonstimulated and *S. aureus*-stimulated AECS, only CXCR1 was expressed on CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Figure 6B).

DISCUSSION

Bacterial infections and inflammatory diseases involving surfaces lined by polarized epithelia often lead to excessive host responses

with the presence of inflammatory cell infiltrates (24-27). In airway diseases like CF, the presence of leukocytes, such as neutrophils and T cells, in the bronchoalveolar lavages suggests that they are involved in host defense mechanisms and/or pathogenesis. The infiltration of these inflammatory cells is regulated by a large cytokine and chemokine network, where airway epithelial cell secretions have an important role in the establishment of an early signaling system for the host immune response. Beside the fact that it is established that IL-8 is involved in PMN attraction (26, 28, 29), T cells are found in the lumen in most airway diseases where IL-8 or eotaxin levels are increased, suggesting that these chemokines could play a role in T cell accumulation. While T cell trafficking into airway tissue plays a critical role in coordinating the immune response to infectious pathogens, the signals responsible for their migration are still not completely determined. The data presented here show that S. aureus, a major human respiratory pathogen, rapidly induces an enhanced polarized IL-8 gradient by the airway epithelial cells. They also show, for the first time, that the airway epithelial cells are able to produce RANTES, IP-10, and eotaxin. More importantly, the airway cell secretion alterations after cell contact with S. aureus have an impact on T cell chemokine receptor pattern and T cell trafficking.

Three-hour contact of live S. aureus with the apical side of the epithelial cells modulates chemokine secretions. Among the chemokines, IL-8 release was the most altered, with a 5-fold increase in the apical S. aureus-stimulated AECS as compared with the nonstimulated AECS. This result is in agreement with the data reported by Ratner and coworkers (21) and by Moreilhon and colleagues (30). Moreover, our double-chamber model allowed us to observe an increased IL-8 secretion in the basolateral compartment; this increase was always lower than the increase of IL-8 secretion in the apical compartment, leading therefore to a marked basolateral to apical gradient of IL-8 when live S. aureus were in contact with the airway epithelial cells. We also showed for the first time that S. aureus interaction with the airway epithelial cells accentuated the secretion of RANTES, eotaxin, and to a lesser extent of IP-10. The quantities of eotaxin, RANTES, and IP-10 produced by the airway epithelial cells were low but still within a range that is compatible with the chemotactic effects seen with purified chemokines (31).

S. aureus is known to induce the chemotaxis of PMNs and macrophages into the airway lumen. To our knowledge, the effects of S. aureus-airway epithelial cell interaction on T cell behavior have never been reported. Our study demonstrates that human purified circulating T cells were attracted by both apical and basolateral S. aureus-stimulated AECS and that the CD4⁺ T cells were the most reactive. This was clearly observed in the presence of the apical S. aureus-stimulated AECS, as the CD4+ T cell chemotaxis index increased up to 3-fold as compared with the nonstimulated apical AECS. Furthermore, IL-8 neutralization in the airway cell supernatants shows a predominant participation of this chemokine in T cell chemotaxis toward basolateral AECS (from 50% to 90%). This suggests that the increase in basolateral IL-8 release, due to the apical interaction of S. aureus with the airway epithelium, might be the main factor that directs CD4⁺ and CD8⁺ T cell migration toward the subepithelial inflamed area. Interestingly, when T cells are in contact with the apical S. aureus-stimulated AECS, IL-8 involvement in the migration process is reduced to 40%, suggesting that other factors play a role in the accumulation of T cells in the lumen. The effect of S. aureus-stimulated AECS on T cell CXCR1 (IL-8 receptor), CXCR3 (IP-10 receptor), and CCR3 (eotaxin and RANTES receptor) expression patterns was analyzed simultaneously with T cell chemotaxis. After 3 h contact with the basolateral S. aureus-stimulated AECS, only CXCR1

was detected at both the CD8⁺ and CD4⁺ T cell surfaces. This is in accordance with the fact that no significant difference was noted between the chemotaxis indices of CD4⁺ and CD8⁺ T cells, and that IL-8 is the major chemoattractant in these supernatants. However, when the T cells were pretreated for 3 h with the basolateral conditioned supernatants, they exhibited accentuated chemotaxis, suggesting that some, if not all, the cells became more sensitive to the chemoattractant in the basolateral media (data not shown). After 3 h of contact with the apical supernatants, a rapid and similar upregulation of CXCR1 on both CD4⁺ and CD8⁺ subsets was observed. This overexpression of the IL-8 receptor on T cells and the increase in IL-8 secretion by the airway cells could explain the augmentation in the CD4⁺ and CD8⁺ T cell chemotaxis indices in the presence of apical supernatants. Nevertheless, only 40% of this chemotaxis involves IL-8. The increased release of RANTES, eotaxin and IP-10 in the apical supernatants of S. aureus-stimulated airway cells and the specific upregulation of CXCR3 and CCR3 on CD4⁺ and CD8⁺ T cells, respectively, could explain the progressively reduced IL-8 chemoattractant potency and the distinct migration capacity of CD4⁺ and CD8⁺ T cells toward the airway cell media. This suggests that during their contact with the supernatants of S. aureus-stimulated airway epithelial cells, CD4⁺ and CD8⁺ T cells modify their surface chemokine receptor pattern and their capacity to migrate toward the airway cell media.

Chemokine receptor expression and migration of T cells have been studied mostly in models of endothelial or intestinal epithelial interaction with gram-negative or gram-positive bacteria (32– 36). Our study clearly suggests that during an early *S. aureus* infection, before any disruption of the airway epithelium, IL-8 released on both sides of the airway epithelium is actively involved in the chemotaxis of circulating CD4⁺ and CD8⁺ T cells. In support of this, supernatants of *S. aureus*-stimulated airway epithelial cells upregulate not only CXCR1 on all T cells, but also CXCR3 on CD4⁺ T cells and CCR3 on CD8⁺ T cells, allowing cell specific migration toward the infectious site. Finally, our results clearly demonstrate that *S. aureus* infection of the airway epithelium is a key factor in recruitment of not only PMN but also lymphocytes in airways.

Conflict of Interest Statement: None of the authors has a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript.

Acknowledgments: The authors thank E. Caliot and Dr. E. Pringault (Laboratoire des interactions lympho-épithéliales, Institut Pasteur, Paris) for helpful suggestions on the double chamber model, Dr. T. J. Foster (Department of Microbiology, Trinity College, Dublin, Ireland) for her generous gift of S. aureus strain (8325-4), Dr. M. Merten (Laboratoire de Pathologie Cellulaire et Moléculaire en Nutrition, Vandoeuvre-Les-Nancy, France) for the MM-39 cell line, C. Macet and Prof. P. N'Guyen (Laboratoire d'Hématologie, CHU Reims, France) for the T cells obtained by elutriation, and Drs. D. Marsh and A. Belaaouaj for critically reviewing the manuscript.

References

- 1. Diamond G, Legarda D, Ryan LK. The innate immune response of the respiratory epithelium. *Immunol Rev* 2000;173:27.
- Larsson B-M, Larsson K, Malmberg P, Palmberg L. Gram positive bacteria induce IL-6 and IL-8 production in human alveolar macrophages and epithelial cells. *Inflammation* 1999;23:217–230.
- Rose F, Dahlem G, Guthmann B, Grimminger F, Maus U, Hanze J, Duemmer N, Grandel U, Seeger W, Ghofrani HA. Mediator generation and signaling events in alveolar epithelial cells attacked by *S. aureus* alpha-toxin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282: L207.
- Message SD, Johnston SL. Host defense function of the airway epithelium in health and disease: clinical background. J Leukoc Biol 2004;75:5–17.
- Kawaguchi M, Kokubu F, Kuga H, Tomita T, Matsukura S, Kadokura M, Adachi M. Expression of eotaxin by normal airway epithelial cells after influenza virus A infection. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;122: 44.

- Tekkanat KK, Maassab H, Miller A, Berlin AA, Kunkel SL, Lukacs NW. RANTES (CCL5) production during primary respiratory syncytial virus infection exacerbates airway disease. *Eur J Immunol* 2002;32: 3276–3284.
- Spurrell JC, Wiehler S, Zaheer RS, Sanders SP, Proud D. 2005. Human airway epithelial cells produce IP-10 (CXCL10) in vitro and in vivo upon rhinovirus infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 289:L85–L95.
- Baggiolini M. Chemokines in pathology and medicine. J Intern Med 2001; 250:91.
- Luster AD. Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. N Engl J Med 1998;338:436.
- Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. J Exp Med 1998;187:875.
- Takata H, Tomiyama H, Fujiwara M, Kobayashi N, Takiguchi M. Cutting edge: expression of chemokine receptor CXCR1 on human effector CD8⁺ T cells. J Immunol 2004;173:2231.
- Lanzavecchia A, Sallusto F. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 2000;290:92.
- Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996;272:60.
- Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte migration. Annu Rev Physiol 1995;57:827.
- Vukmanovic-Stejic M, Vyas B, Gorak-Stolinska P, Noble A, Kemeny DM. Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. *Blood* 2000;95:231.
- D'ambrosio D, Sinigaglia F. Chemokines and their receptors: trafficking cues for Th1 and Th2 cells. *Eur Cytokine Netw* 2000;11:495.
- Katchar K, Eklund A, Grunewald J. Expression of Th1 markers by lung accumulated T cells in pulmonary sarcoidosis. *J Intern Med* 2003;254: 564–571.
- Campbell JJ, Brightling CE, Symon FA, Qin S, Murphy KE, Hodge M, Andrew DP, Wu L, Butcher EC, Wardlaw AJ. Expression of chemokine receptors by lung T cells from normal and asthmatic subjects. *J Immunol* 2001;166:2842.
- Da Silva MC, Zahm JM, Gras D, Bajolet O, Abely M, Hinnrasky J, Milliot M, De Assis MC, Hologne C, Bonnet N, et al. Dynamic interaction between airway epithelial cells and *Staphylococcus aureus*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004;287:L543.
- Kahl BC, Goulian M, van Wamel W, Herrmann M, Simon SM, Kaplan G, Peters G, Cheung AL. *Staphylococcus aureus* RN6390 replicates and induces apoptosis in a pulmonary epithelial cell line. *Infect Immun* 2000;68:5385.
- Ratner AJ, Bryan R, Weber A, Nguyen S, Barnes D, Pitt A, Gelber S, Cheung A, Prince A. Cystic fibrosis pathogens activate Ca2+-dependent mitogen-activated protein kinase signaling pathways in airway epithelial cells. *J Biol Chem* 2001;276:19267.
- Llewelyn M, Cohen J. Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. Lancet Infect Dis 2002;2:156.
- Merten MD, Kammouni W, Renaud W, Birg F, Matter MG, Figarella C. A transformed human tracheal gland cell line MM-39 that retains serous secretory functions. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;15:520.
- Hubeau C, Lorenzato M, Couetil JP, Hubert D, Dusser D, Puchelle E, Gaillard D. Quantitative analysis of inflammatory cells infiltrating the cystic fibrosis airway mucosa. *Clin Exp Immunol* 2001;124:69.
- Cosio MG, Majo J, Cosio MG. Inflammation of the airways and lung parenchyma in COPD: role of T cells. *Chest* 2002;121:160S.
- Nasreen N, Mohammed KA, Hardwick J, Van Horn RD, Sanders KL, Doerschuk CM, Hott JW, Antony VB. Polar production of interleukin-8 by mesothelial cells promotes the transmesothelial migration of neutrophils: role of intercellular adhesion molecule-1. *J Infect Dis* 2001;183:1638.
- Liu L, Mul FP, Lutter R, Roos D, Knol EF. Transmigration of human neutrophils across airway epithelial cell monolayers is preferentially in the physiologic basolateral-to-apical direction. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;15:771.
- McCormick BA, Hofman PM, Kim J, Carnes DK, Miller SI, Madara JL. Surface attachment of *Salmonella typhimurium* to intestinal epithelia imprints the subepithelial matrix with gradients chemotactic for neutrophils. *J Cell Biol* 1995;131:1599.
- Jahn HU, Krull M, Wuppermann FN, Klucken AC, Rosseau S, Seybold J, Hegemann JH, Jantos CA. Suttorp. Infection and activation of airway epithelial cells by *Chlamydia pneumoniae*. J Infect Dis 2000;182: 1678.
- Moreilhon C, Gras D, Hologne C, Bajolet O, Cottrez F, Magnone V, Merten M, Groux H, Puchelle E, Barbry P. Live Staphylococcus aureus
and bacterial soluble factors induce different transcriptional responses in human airway cells. *Physiol Genomics* 2005;20:244.

- 31. Fahy O, Porte H, Senechal S, Vorng H, McEuen AR, Buckley MG, Walls AF, Wallaert B, Tonnel AB, Tsicopoulos A. Chemokineinduced cutaneous inflammatory cell infiltration in a model of Hu-PBMC-SCID mice grafted with human skin. Am J Pathol 2001;158: 1053.
- 32. Shaw SK, Hermanowski-Vosatka A, Shibahara T, McCormick BA, Parkos CA, Carlson SL, Ebert EC, Brenner MB, Madara JL. Migration of intestinal intraepithelial lymphocytes into a polarized epithelial monolayer. *Am J Physiol* 1998;275:G584.
- Kim CH. Chemokine-chemokine receptor network in immune cell trafficking. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord 2004;4:343.
- McCormick BA, Colgan SP, Delp-Archer C, Miller SI, Madara JL. Salmonella typhimurium attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signalling to subepithelial neutrophils. J Cell Biol 1993;123:895.
- 35. Gergel EI, Furie MB. Populations of human T lymphocytes that traverse the vascular endothelium stimulated by *Borrelia burgdorferi* are enriched with cells that secrete gamma interferon. *Infect Immun* 2004; 72:1530.
- McCormick BA, Parkos CA, Colgan SP, Carnes DK, Madara JL. Apical secretion of a pathogen-elicited epithelial chemoattractant activity in response to surface colonization of intestinal epithelia by *Salmonella typhimurium. J Immunol* 1998;160:455.

Les principaux résultats de cette étude sont les suivants :

- La sécrétion apicale et basolatérale d'IL-8, d'éotaxine et de RANTES par les cellules épithéliales bronchiques est significativement plus importante après stimulation des cellules par *S. aureus* par rapport aux cellules contrôles.
- S. aureus induit une augmentation du chimiotactisme des LT CD3⁺, CD4⁺ et CD8⁺ vis-à-vis des surnageants de culture apicaux et basolatéraux des cellules épithéliales bronchiques
- 3) L'inhibition de l'IL-8 dans les surnageants apicaux et basolatéraux des cellules épithéliales bronchiques induit une inhibition du chimiotactisme des :
 - LT CD8⁺ de 50 et 55 % respectivement
 - LT CD4⁺ de 40 et 90 % respectivement
- 4) Après contact des LT avec les surnageants apicaux des cellules épithéliales bronchiques stimulées par *S. aureus*
 - L'expression de CXCR1 augmente sur les LT CD4⁺ et CD8⁺
 - L'expression de CXCR3 augmente sur les LT CD4⁺
 - L'expression de CCR3 augmente sur les LT CD8⁺
- 5) Après contact des LT avec les surnageants basolatéraux des cellules épithéliales bronchiques stimulées par *S. aureus*
 - L'expression de CXCR1 augmente sur les LT CD4⁺.

Ces résultats suggèrent que, lors d'une infection précoce de l'épithélium respiratoire par *S. aureus*, la production importante d'IL-8, à la fois au niveau apical et basolatéral, induit le chimiotactisme des LT CD4⁺ et CD8⁺ circulants. Le CXCR1, récepteur de l'IL-8, déjà présent sur les LT et surexprimé lors du contact des LT avec les surnageants basolatéraux de cellules en contact avec *S. aureus*, semble etre impliqué dans le chimiotactisme accru des LT. En conclusion, nos résultats montrent dans un modèle non-CF que le recrutement des LT est important et accentué lors d'une infection respiratoire à *S. aureus* grâce à l'augmentation de la production de l'IL-8 par les cellules épithéliales bronchiques.

ARTICLE 2

Impaired chemokine secretion and T cell chemotaxis following Staphylococcus aureus interaction with cystic fibrosis epithelium

Al Alam D., Deslee G., Tournois C., Lamkhioued B., Lebargy F., Belaaouaj A., Merten M., Guenounou M. and Gangloff S.C.

(En cours de soumission).

ARTICLE 2

Dérégulation de la sécrétion de chimiokines et du chimiotactisme des lymphocytes T après interaction de *Staphylococcus aureus* avec les cellules épithéliales bronchiques mucoviscidosiques polarisées.

S. aureus est l'une des premières bactéries identifiées dans les voies aériennes à un stade très précoce chez des personnes atteintes de mucoviscidose (CF) (Goerke *et al*, 2000). Dès l'âge de 2 à 6 mois, 35 % des nourrissons CF présentent une infection respiratoire à *S. aureus* associée à une inflammation caractérisée par un afflux de PNN et une augmentation de chimiokines pro-inflammatoires tels que l'IL-8 dans le lavage broncho-alvéolaire. Cependant, la clairance de *S. aureus* par les cellules épithéliales respiratoires CF semble plus faible que sa clairance par les cellules épithéliales respiratoires non-CF. De plus, un nombre élevé de LT est retrouvé dans les poumons de patients CF surtout au niveau distal (Hubeau *et al.*, 2001a). Nous avons précédemment montré un rôle important de *S. aureus* dans la sécrétion de chimiokines et le chimiotactisme des LT par des cellules épithéliales bronchiques normales. Cependant, dans la mucoviscidose, le rôle de *S. aureus* dans la progression de la maladie reste mal défini.

En utilisant d'une part le modèle de culture en double chambre que nous avons développé, et les lignées de cellules épithéliales bronchiques humaines non-CF MM-39 et CF KM-4, et d'autre part des LT circulants isolés à partir du sang de patients atteints de mucoviscidose et de patients contrôle nous avons étudié :

- L'effet de S. aureus sur la sécrétion de chimiokines par les cellules épithéliales bronchiques humaines non-CF MM-39 et CF KM-4
- Le chimiotactisme des LT primaires de patients CF et de donneurs sains vis-à-vis des surnageants de culture des cellules épithéliales bronchiques non-CF et CF stimulées ou non par S. aureus
- L'expression des récepteurs des chimiokines sur les LT non-CF et CF.

Impaired chemokine secretion and T cell chemotaxis following *Staphylococcus aureus* interaction with cystic fibrosis epithelium

Denise Al Alam¹, Gaetan Deslee^{2,3}, Claire Tournois¹, Bouchaib Lamkhioued¹, François Lebargy^{2,3}, Marc Merten⁴, Azzaq Belaaouaj³, Moncef Guenounou¹ and Sophie Catherine Gangloff¹

¹ Laboratoire d'Immunologie et de Microbiologie, EA3796, IFR53, UFR de Pharmacie,

Reims, France

² Service de Pneumologie, CHU de Reims, Reims, France

³ INSERM UMRS 514, IFR53, Reims, France

⁴ INSERM EMI0014, Faculté de Médecine, Vandoeuvre Les Nancy, France

Corresponding author: Pr. Gangloff Sophie

Address : Laboratoire d'Immunologie et de Microbiologie

EA3796, IFR53, UFR de Pharmacie

1 avenue du Maréchal Juin

51100 Reims, France

Tel : +33 (0)3 26 91 35 95

Fax : +33 (0)3 26 91 37 20

E-mail : <u>Sophie.gangloff@univ-reims.fr</u>

Running title : Cystic fibrosis and T cell chemotaxis

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is one of the major pathogens infiltrating the lungs of cystic fibrosis (CF) patients. Upon S. aureus infection, airway epithelial cells produce high levels of chemokines that enhance T cell chemotaxis. Although increased numbers of lymphocytes are present in the airways and bronchoalveolar lavage fluid of CF patients, the mechanisms responsible for their accumulation and the role of S. aureus are still largely unknown. This study aims to investigate S. aureus impact on chemokine secretion by CF epithelial cells and subsequent chemotaxis of CF T cells. Non-CF and CF airway epithelial cells were grown in a double chamber model then apically stimulated with S. aureus. Supernatants were quantified for chemokine secretions and assayed for T cell chemotaxis using a Boyden chamber. We showed that CF epithelial cells secreted larger amounts of IL-8, GROa, MIG, MIP-3β and MCP-1 than non-CF epithelial cells. S. aureus interaction with epithelial cells increased chemokine production by non-CF cells, whereas it had no effect on CF cells. Interestingly, CF T cell chemotaxis was always greater than non-CF T cell chemotaxis and CF T cells expressed more CXCR1 as compared to non-CFT cells. These observations suggest that IL-8 and its receptor CXCR1 contribute to the recruitment of T cells in CF patients, and could be used as therapeutic targets in CF.

Key words: Cystic fibrosis, airway epithelial cells, *Staphylococcus aureus*, T lymphocytes, chemokines.

ABBREVIATIONS

- APC, allophycocyanin
- CD, cluster of differentiation
- CF, cystic fibrosis
- CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
- CI, chemotaxis index
- GROa, growth-related oncogene alpha
- HAEC, human airway epithelial cells
- mAb, monoclonal antibody
- MCP-1, monocyte chemotactic protein-1
- MIG, monokine induced by gamma-interferon
- MIP-3 β , macrophage inflammatory protein-3 β
- TER, trans-epithelial Resistance

INTRODUCTION

Cystic fibrosis (CF) is the most common autosomal recessive disorder in the Caucasian population. Although many organs are affected in CF, lung disease is responsible for more than 90% of the mortality among CF patients. It is caused by mutations in the transmembrane conductance regulator (CFTR) gene resulting in defective regulation of chloride transport by epithelial cells, leading to airway surface liquid dehydration, impaired mucociliary clearance and chronic inflammation (1). The hallmarks of the lung pathology in CF are bacterial colonization and infection of the airways inducing lung inflammation. Staphylococcus aureus (S. aureus), is one of the first pathogens isolated from lungs of CF patients (2). Early colonization of S. aureus is suspected to damage the CF airway epithelium and to lead to an excessive inflammatory response as earlier reported for *P. aeruginosa* in CF airway graft (3). Upon interaction with the epithelium, S. aureus is known to induce T cell activation via superantigens (4). Moreover, the capacity of CF epithelial cells to kill S. aureus is defective compared to non-CF epithelial cells (5). Many studies support the concept of excessive inflammatory responses in the CF lung, even in the absence of infections (6, 7). This hypothesis of primary inflammation came first from clinical observations of inflammation preceding detectable infection in CF fetuses (8). IL-8 is the most studied chemokine in CF inflammation so far and little is known about other chemokines. Under basal conditions and in the absence of infections, the levels of IL-8 and neutrophils were increased in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid of CF patients as compared to control subjects (9-12). Yet, it remains unclear whether this increased response is related to an infectious stimulus, to a defect of the airway epithelium or both. Based on the deleterious effect of neutrophils and their elevated number in the airway lumen, many groups consider CF as a neutrophil mediated disease. However, other studies based on elevated T lymphocytes number at the distal level of the bronchial tree in CF patients, have reported that CF is also a lymphocytic disease (13, 14).

Both, *S. aureus* infection and T cell infiltration in the lungs of CF patients occur early in the pathogenesis of CF. However, it remains unclear whether there is a link between *S. aureus* infection and T cell accumulation in the lungs. Using polarized non-CF human airway epithelial cells (HAEC), we have previously reported that *S. aureus* induced an increase of apical and basolateral release of IL-8 and enhanced T cell chemotaxis (15). In this report we extended our previous studies by studying chemokine secretion by CF and non-CF HAEC, under basal conditions and after *S. aureus*-infection and its consequences on primary CF T cell chemotaxis.

MATERIALS AND METHODS

CF patients' characteristics

Fourteen CF patients (27 \pm 4.8 years old) and ten age-matched healthy subjects (27.2 \pm 5.5 years old) were recruited at the service of pneumologie, CHU de Reims, France. Each CF patient and healthy volunteer provided written informed consent before blood donation, and the study was approved by the local Ethics Committee. Nine patients had the Δ F508 mutation and were homozygotous; the others were heterozygotous (table 1).

Number/sex	Age		Р.	<i>S</i> .	А.	В.	Н.
of patients	(Years)	Genotype	aeruginosa	aureus	fumigatus	cepacia	influenzae
8M/1F	22-37	$\Delta F508/\Delta F508$	6	5	4	2	0
1 M	26	ΔF508/L165S	1	0	0	0	0
1M	35	ΔF508/R117C	0	0	0	0	1
2M	22-29	ΔF508/G542K	2	0	1	0	0
1F	24	Δ F508/2184INSA	1	1	0	0	0

Table 1: Clinical Characteristics of CF patients.

Most of the patients were infected with *P. aeruginosa*, associated or not with other microorganisms such as *S. aureus*, *Aspergillus fumigatus*, *Haemophilus influenzae* or *Burkholderia cepacia* (table 1). Patients taking systemic corticosteroids, with diabetes or allergic bronchopulmonary aspergillosis were excluded from this study. The healthy subjects included in this study had no airway inflammation, infection or allergic disease and none of them had recently received any medication. Blood samples of 40 mL were colleted by venipuncture into ACD-A endotoxin-free tubes (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France).

Bacterial culture

S. aureus, a wild type laboratory strain (NCTC 8325 cured of prophages) was a generous gift from T.J. Foster (Department of Microbiology, Trinity College, Dublin, Ireland). Bacterial strains were maintained at –80°C, and streaked onto trypticase soy broth agar plates to obtain single colonies prior to use (TSB-bioMérieux, Lyon, France). *S. aureus*, grown overnight in

TSB medium at 37°C under agitation, were washed with sterile PBS and resuspended in the cells growth milieu DMEM/F12 at a starting $OD_{\lambda=600nm}$ of 0.1. The bacteria were cultured at 37°C under agitation up to an exponential growth phase ($OD_{\lambda=600nm} = 0.6-0.7$) and used for the interaction experiments as described below.

HAEC culture

The tracheal gland serous cell lines MM-39 and KM4 used in this study originated from a normal and a CF (Δ F508 / Δ F508) patient respectively and were cultured as previously described (16, 17). Briefly, cells were grown at 37°C under 5% CO₂ atmosphere on type I collagen-coated flasks in DMEM/F12 mixture (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 1% Ultroser G serum substitute (Biosepra, Cergy Pontoise, France), glucose (10 g/L), sodium pyruvate (0.33 g/L) and antibiotics. Polarized cell monolayers were prepared by seeding 5 x 10⁵ cells/cm² in 500 µL DMEM/F12 on the top of a microporous polyester support, and 700 µL of DMEM/F12 were disposed in the lower compartments (Becton Dickinson Labware, Le Pont de Claix, France). Confluent HAEC showed a glandular serous type with a polar secretion of the Secretory LeukoProtease Inhibitor, a serous cell-specific secretory marker (data not shown).

Cell – S. aureus interaction

At confluence, monolayers were washed twice with PBS and 700 μ L fresh DMEM/F12 were added in the lower compartment. Monolayers were then apically stimulated with 500 μ L of different concentrations of S. *aureus* 3.3 x 10⁷ CFU/mL or 10⁸ CFU/mL for 6h for TER measurements. For chemokine quantification and chemotaxis assays, cells were apically stimulated with S. *aureus* 3.3 x 10⁷ CFU/mL for 3h. The apical volumes were adjusted to 700 μ L and both apical and basolateral supernatants were harvested, centrifuged to eliminate cell and bacteria and stored for ELISA and chemotaxis assays. To verify the absence of *S. aureus* in the basolateral compartment, 100 μ L of this supernatant were streaked onto nutrient agar

plates after the 3h-interaction period. The plates were incubated at 37°C for 18h and bacteria were counted.

Trans-Epithelial Resistance (TER) measurements

The TER was measured using the Millicell-ERS Resistance system (Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France). After calibrating the instrument against culture medium, one electrode was placed inside the insert and the other outside. Empty inserts served as blanks. The TER (ohms×cm²) was calculated from the following equation: (TER_{sample}-TER_{blank})×surface area. The TER was measured in the presence of *S. aureus* (3.3 x 10^7 CFU/mL and 10^8 CFU/mL) at different time points up to 6h.

Enzyme-Linked Immunosorbent assay

The chemokine levels of HAEC supernatants were quantified using sandwich ELISA and specific monoclonal antibodies (mAb) directed against GROα, IL-8, MIG, MCP-1 and MIP-3β following the manufacturer's instructions (Duoset and Quantikine, R&D Systems, Lille, France). The detection limit was 5 pg/mL for GROα, IL-8, MIG and MCP-1 and 1 pg/mL for MIP-3β.

Human lymphocytes isolation and purification

Each blood sample was diluted at 1:2 in RPMI-1640 culture medium and passaged over Ficoll-Hypaque to remove erythrocytes, granulocytes and cellular debris. CD3⁺ T lymphocytes were obtained by immunomagnetic negative selection using the pan T cell Biotin-antibody cocktail (Microbeads MACS, Miltenyi Biotech, Paris, France).

Chemokine receptors expression analysis by flow cytometry

Purified CD3⁺ (5 x 10^{5} /mL) were incubated with FITC-, PE- or APC-conjugated mAbs or control isotype Abs at 4°C for 20 min. After extensive washing, cells were resuspended in PBS. Cell-associated immunofluorescence was analyzed by FACS Aria using CellQuest software (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France). At least 10000 gated events were

evaluated for each condition. Rat anti-human CCR3 mAb PE-conjugated and several mouse anti-human mAbs PE-conjugated (CD3, CXCR3, CCR5 and CCR7), APC-conjugated (CXCR1 and CXCR2) and FITC-conjugated (CCR4) were used for flow cytometry. Appropriate mAb isotypic controls were included in each analysis, with acquisition and analysis gates set accordingly. All antibodies were purchased from Becton Dickinson (Le Pont de Claix, France).

T cell chemotaxis assay

Cell chemotaxis assays were performed using a 48-well microchemotaxis chamber (Neuroprobe, Gaithersburg, MD, USA) and conducted as previously described (18, 19). Migration of purified CD3⁺ cells in response to human recombinant (rh) IL-8 and to HAEC supernatants was performed on a polycarbonate filter (5- μ m pore-size) coated with human fibronectin at 20 μ g/mL. CD3⁺ cells (5 x 10⁶ cells/mL) were loaded into the chambers and incubated at 37°C and 5 % CO₂ for 1h, then the filters were fixed and stained with a RAL kit (Odil, Talant, France). Cells were counted by light microscopy in five high powered fields (magnification X40). The results from different chemotaxis assays were expressed as chemotaxis index CI = (test count)/(control count). Test count represents the mean number of cells which migrated towards HAEC supernatants or rh IL-8, and control count is the mean number of cells which migrated in response to RPMI.

For neutralization experiments, rh IL-8 or HAEC supernatants were preincubated with a mouse anti-human IL-8 mAb 1 μ g/mL at 37°C for 30 min. Normal mouse serum was used as negative control.

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using Statview software version 4.57.0.0. All Data are expressed as medians. Statistical comparisons of *S. aureus*-stimulated HAEC and non-stimulated cells (within-cell line comparisons) were performed using non-parametric two-

tailed Wilcoxon signed rank tests. Between-group comparisons of the change from non-CF to CF cell lines secretion analysis, non-CF and CF T cell chemotaxis and chemokine receptor expression on non-CF and CF T cells were performed using the non-parametric Mann-Whitney test. p levels ≤ 0.05 were considered significant.

RESULTS

TER variations in non-CF and CF HAEC monolayers in the presence of S. aureus

TER is an indicator of epithelial monolayer tight junction formation. In order to preserve HAEC monolayer's integrity and to avoid cellular permeability, the effect of live *S. aureus* on HAEC monolayer's integrity was followed by TER measurements over a 6h course-time interaction. Figure 1 shows that unstimulated non-CF cells presented a stable but higher TER than unstimulated CF cells (300 Ohm.cm⁻² *vs* 280 Ohm.cm⁻²). No change in TER or cellular permeability was observed during the four first hours, when non-CF and CF cells were incubated with *S. aureus* (3.3 x 10⁷ CFU/mL or 10⁸ CFU/mL). After 4h-interaction, non-CF HAEC TER diminished down to 250 Ohm.cm⁻² whereas the CF HAEC TER remained unchanged (Fig 1). No bacterial growth was observed after plating basolateral supernatants of non-CF and CF HAEC implying that under these conditions the non-CF or CF epithelium could still be considered as confluent.

To further analyze the impact of an early *S. aureus* infection on chemokine secretion in a polarized model before any changes in TER, 3.3×10^7 CFU *S. aureus*/mL and the 3h-interaction were selected as in our previous study.



FIGURE 1: TER measurements in non-CF (A) and CF (B) HAEC monolayers before (square) and after apical stimulation with *S. aureus* 3.3×10^7 CFU/mL (triangle) or 1×10^8 CFU/mL (circle). Data are expressed as median of at least 5 independent experiments realized in duplicates.

CF epithelial HAEC secreted larger amounts of chemokines than non-CF HAEC

To study the differential secretion of chemokines by non-CF and CF HAEC, the apical and basolateral secretion of 38 chemokines were studied using chemokine array (data not shown). Among these chemokines, only IL-8, GRO α , MCP-1, MIG and MIP-3 β presented differential profiles, and were further quantified by ELISA. IL-8, GRO α , MCP-1, MIG and MIP-3 β were detected in the apical CF HAEC supernatants (fig 2A) and also in the basolateral CF HAEC supernatants except for MIP-3 β (fig 2B). IL-8, GRO α , MIG and MIP-3 β were also detected in the apical non-CF HAEC supernatants (fig 2A), but only IL-8 and GRO α were detected in the basolateral non-CF HAEC supernatants (fig 2B). Also in basal conditions, CF HAEC secreted significantly higher amounts of IL-8 and GRO α than non-CF HAEC in both apical and basolateral supernatants (fig 2A, 2B). MIG and MIP-3 β levels were significantly higher in apical CF HAEC supernatants (fig 2A).

S. aureus enhance chemokine release by HAEC

When non-CF HAEC were stimulated with *S. aureus*, the levels of IL-8, GRO α , MCP-1 and MIG were significantly increased in both apical and basolateral non-CF HAEC supernatants, as compared to unstimulated cells (fig 2C, 2D). MIP-3 β was increased only in *S. aureus*-stimulated non-CF HAEC supernatants (fig 2C, 2D). While *S. aureus* interaction with CF HAEC increases the production of MIG and MIP-3 β , it had no effect on IL-8, GRO α and MCP-1 in both apical and basolateral supernatants (fig 2C, 2D).



FIGURE 2: Chemokine secretion by airway epithelial cells after apical *S. aureus* stimulation. HAEC were grown in the double chamber model. Apical (A) and basolateral (B) secretion of chemokines in non-CF HAEC supernatants and CF HAEC supernatants at basal conditions. Apical (C) and basolateral (D) secretion of chemokines in non-CF HAEC supernatants and CF HAEC supernatants after contact with culture medium (-) or with *S. aureus* 3.3 x 10⁷ CFU/mL (+). Results are median of at least 5 independent experiments realized in duplicates. ND: not detected. * p ≤ 0.05 using a Wilcoxon nonparametric test to compare unstimulated and *S. aureus*-stimulated HAEC supernatants, † p ≤ 0.05 using a Mann and Whitney U test to compare non-CF and CF HAEC supernatants.

T cell chemotaxis towards HAEC supernatants

To test whether non-CF and CF primary purified CD3⁺ T cells have the same ability to migrate towards non-CF and CF HAEC supernatants, chemotaxis assays were carried out. As shown in fig 3A and 3B, the chemotaxis of CF T cells is significantly higher than the chemotaxis of non-CF T cells towards both apical and basolateral non-CF and CF HAEC supernatants. After *S. aureus*-interaction with non-CF HAEC, there is a significant increase of

non-CF and CF T cell chemotaxis towards both apical and basolateral non-CF HAEC supernatants. Furthermore, the chemotaxis of CF T cells is significantly higher than the chemotaxis of non-CF T cells towards apical and basolateral *S. aureus*-stimulated non-CF HAEC supernatants (48 *vs* 24.7 and 32.2 *vs* 20.1 respectively). After *S. aureus*-interaction with CF HAEC, the chemotaxis indices for non-CF and CF T cells towards apical and basolateral HAEC supernatants as compared to unstimulated CF HAEC supernatants are unchanged (19.4 *vs* 16.3 and 14.2 *vs* 18 for non-CF T cells, and 53.5 *vs* 51.6 and 25.9 *vs* 29.3 for CF T cells respectively).



FIGURE 3: T cell migration towards HAEC supernatants. Chemotaxis assays were assessed in a boyden chamber. Non-CF (white bars) and CF (black bars) T cell chemotaxis towards apical and basolateral unstimulated (-) and *S. aureus*-stimulated (+) non-CF HAEC supernatants (A) or CF HAEC supernatants (B). All data were expressed as medians of chemotaxis indices from at least 10 independent experiments realized in triplicates. * $p \le 0.05$ using a Wilcoxon nonparametric test to compare chemotaxis towards non stimulated and *S. aureus*-stimulated HAEC supernatants, † $p \le 0.05$ using a Mann and Whitney U test to compare non-CF and CF T cell chemotaxis.

Involvement of IL-8 in lymphocyte chemotaxis

Since IL-8 is chemotactic for non-CF T cells and since CF HAEC supernatants contain significant levels of IL-8, we anticipated that IL-8 might also exhibit chemotactic activity towards CF-T cells.[15] As shown in figure 4, the CF T cell chemotaxis towards rhIL-8 is significantly higher than the chemotaxis of non-CF T cells. The neutralizing anti-IL-8 antibodies used as previously at 1 μ g/mL, were found to inhibit the chemotaxis of CF and non-CF T cells towards as much as 10 times the quantity of IL-8 found in the different supernatants (fig 4).



FIGURE 4: T cell chemotaxis index in response to rh IL-8. The chemotaxis indices of non-CF (square) and CF (diamond-shaped) T cells were calculated in the absence (empty) or presence (filled) of neutralizing IL-8 antibodies (1 μ g/mL). Data are medians of at least 10 independent experiments realized in triplicates. † p ≤ 0.05 using a Mann and Whitney U test to compare non CF and CF T cell chemotaxis.

The neutralization of IL-8 in the supernatants with IL-8 mAb caused a considerable inhibition of both non-CF and CF T cell chemotaxis. The percentages of chemotaxis inhibitions of non-CF T cells towards apical *S. aureus*-stimulated and unstimulated non-CF HAEC supernatants were equal to 83 % and 66 % respectively. Towards basolateral *S. aureus*-stimulated and unstimulated non-CF HAEC supernatants, they were equal to 80 % and 66% respectively (fig 5A). Moreover, CF T cell chemotaxis inhibitions towards apical *S. aureus*-stimulated and unstimulated CF HAEC were equal to 86 % and 85 % respectively, and 67 % and 73 % for

basolateral *S. aureus*-stimulated and unstimulated CF HAEC supernatants respectively (fig 5B). Mouse IgG, used as control Ab, had no effect on T cell chemotaxis towards rhIL-8 or cell supernatants.





FIGURE 5: IL-8 involvement in T cell chemotaxis. The inhibition percentages of T cell chemotaxis were calculated in the presence of neutralizing IL-8 antibodies at a concentration of 1 μ g/mL. Inhibition percentages in the absence (-) or presence (+) of *S. aureus* of non-CF T cell chemotaxis towards apical and basolateral non-CF HAEC supernatants (A) or CF HAEC supernatants (B). Data are medians of at least 10 independent experiments realized in triplicates.

Expression of chemokine receptors on non-CF and CF CD3⁺ T cells

To further examine the involvement of IL-8 in T cell chemotaxis, the expression of chemokine receptors was analyzed using flow cytometry. As shown in fig 6, the percentage of $CD3^+ CXCR1^+$ cells was higher in CF T cells as compared to non-CF T cells (2.8 % vs 7.9 % respectively, p≤0.05). Inversely, the percentages of $CD3^+CXCR3^+$ cells and $CD3^+CCR7^+$ cells were significantly lower on CF T cells as compared to non-CF T cells. The percentages of $CD3^+CXCR2^+$ cells, $CD3^+CCR3^+$ cells and $CD3^+CCR5^+$ cells were identical in CF and non-CF T cells.



FIGURE 6: Percentage of chemokine receptor expression on CD3⁺ cells. Flow cytometric analyses of non-CF (white bars) and CF (black bars) purified lymphocytes were done with control non-binding anti-isotype Ab and human CXCR1, CXCR2, CXCR3, CCR3, CCR4, CCR5 and CCR7 mAb. Data are medians of at least 10 independent experiments. $\ddagger p \le 0.05$ using a Mann and Whitney U test to compare non CF and CF chemokine receptor expression.

DISCUSSION

CF disease is characterized by chronic respiratory inflammation and bacterial infections of the lungs of CF patients leading to excessive host responses associated with inflammatory cell infiltrates (11, 12, 14). *S. aureus* is one of the first pathogens that colonize the respiratory tract of these patients. However, few studies have been carried out on the specific role of *S. aureus* in airway inflammatory responses in CF disease. Recently, T cell trafficking into pulmonary tissue was described as a critical component of host defence against respiratory pathogens. An elevated T cell number in the CF bronchial epithelium has been reported and suggest a prominent implication of T cells in CF disease (14). Nevertheless, the mechanisms inducing T cell infiltration in CF epithelium remain unknown. The data presented here show for the first time that CF T cells present an enhanced chemotaxis toward IL-8 as compared to non-CF T cells. They also show, for the first time, that circulating T cells from CF patients express a specific cell chemokine receptor pattern with 7.9% of CF CD3⁺ T cells expressing CXCR1, whereas only 2.8% of non-CF CD3⁺ T cells express this receptor. More importantly, *S. aureus* infection of the CF HAEC does not affect CF T cell chemotaxis.

The TER measurements after *S. aureus*-HAEC monolayers infection revealed that non-CF HAEC are more sensitive to live *S. aureus* than CF HAEC. The decrease in the TER seen after 3h of *S. aureus* infection in our polarized human non-CF tracheal cell model with 3.3 x 10^7 or 10^8 *S. aureus* CFU/mL could be linked to non-CF HAEC damage such as necrosis or important bacterial internalization as seen after 3h-interaction with 10^8 CFU/mL *S. aureus* (20, 21). To avoid these effects and to analyze only the early *S. aureus* infection impact on chemokine secretion by tight polarized HAEC and on T cell chemotaxis, we used our previous conditions, 3h-cell interactions with 3.3×10^7 *S. aureus* CFU/mL (a ratio of 30 bacteria for 1 cell).

Excessive airway inflammation of the lungs of CF patients occurs even in the absence of infections (8). To elucidate this point, we screened chemokine production in CF and non-CF HAECS using protein array (data not shown). IL-8, the most studied chemokine in CF to date, was detected in the supernatants of both cell types. We also found that in absence of *S. aureus* infection, polarized CF HAEC secreted higher levels of chemokines particularly IL-8, GRO α , MCP-1, MIP-3 β and MIG as compared to non-CF HAEC. These results are in agreement with data showing increased IL-8 expression in CF HAEC when compared to non-CF HAEC (22-24). Indeed, our data corroborate the hypothesis of a basal exaggerated inflammatory response in CF epithelium, with higher amounts of IL-8 in CF HAECS as compared to non-CF HAECS, raising the possibility that abnormalities in CFTR may constitutively alter pathways mediating inflammation.

Most of the bacterial interactions with CF HAEC *in vivo* and *in vitro* were investigated with *P. aeruginosa* (25, 26). The BAL of CF patients infected with *P. aeruginosa* contain high levels of IL-8, MCP-1 and MIG as compared to BAL of non-infected CF patients or healthy volunteers (27). Reiniger *et al.* showed that *P. aeruginosa* increased IL-8 and GROa production by non-CF HAEC while it had no effect on their secretions by CF HAEC (25). Here, we show that *S. aureus* interaction with non-CF HAECS increases IL-8 secretion, but also GROa, MCP-1, MIP-3 β and MIG during an early stage of infection; whereas, in CF HAEC, *S. aureus* induces an increase of MIG and MIP-3 β secretions, and had no effect on IL-8, GROa and MCP-1.

T cells are critical cells in inflammatory diseases, with the capacity to initiate, amplify and terminate antigen-specific immune responses. A number of pulmonary diseases are characterized by preferential accumulation of type 1 or type 2 T cells, which specifically modulate defined aspects of pathogenesis in affected tissues (28). T cells infiltrating the airway of patients with chronic obstructive pulmonary disease and pulmonary sarcoidosis

were shown to have a type 1 profile and to express high levels of CXCR3, the IP-10 receptor (29). T cells isolated from asthmatic human BAL fluid were found to express the putative Th2 receptors CCR3 and CCR4, but also the Th1 receptors CCR5 and CXCR3 (30). In this study, the percentages of CD3⁺ expressing CCR5, CCR4 and CXCR2 were identical in blood samples from both CF and non-CF groups. The percentages of CD3⁺CCR7⁺ and CD3⁺CXCR3⁺ were significantly lower in CF T cells as compared to non-CF T cells. A lower expression of CXCR3 on CD4 T cells has already been seen in patients with idiopathic pulmonary fibrosis as compared to controls but these T cells presented also an increase in the expression of CCR4. CXCR1 was reported to be expressed preferentially on neutrophils, and recent studies showed that CD8 and CD4 T cells can also express CXCR1 (15, 31-33). Here we show that both CF and non-CF T cells expressed CXCR1. Interestingly, the percentage of CD3⁺CXCR1⁺ on CF T cells was significantly higher than on non-CF T cells. This could explain why CF T cells presented a higher chemotaxis index towards HAEC supernatants when compared to non-CF T cells. IL-8 neutralization inhibited CF and non-CF T cell chemotaxis in a similar range, suggesting that CXCR1 could be important for T cell migration before any infection. Nevertheless, MIG production by CF HAEC before any infection, its significant increase after S. aureus interaction with CF HAEC and the CXCR3 expression on CF T cell, suggests a potential implication of CXCR3/MIG in the CF T cell chemotaxis.

Taken together, in physiological conditions, the basal levels of IL-8 seem to be amplified by *S. aureus* interaction, leading to an increase of T cell chemotaxis towards the airway cells. In CF patients, the expression of CXCR1 on circulating T cells is thus likely to contribute to an excessive and persistent inflammatory response that is not enhanced by *S. aureus* infection. IL-8 and its receptor CXCR1 are key factors in T cell homing to the lung of CF patients before infections. Targeting CXCR1 and/or IL-8 may help to develop new concepts for the treatment of CF.

115

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Dr. T.J. Foster (Department of Microbiology, Trinity College, Dublin, Ireland) for her generous gift of *S. aureus* strain 8325-4, all the stuff members, Doctors and nurses, of the service of Pneumology, the service of infectiology and Dr. Christine Rouger (CHU Reims) for blood samples, Dr. Michel Abely at CRCM (Centre de Ressources et de Compétences sur la Mucoviscidose) and Dr. Edith Puchelle (INSERM, Reims) for helpful discussions. We specially thank the patients and the healthy volunteers who accepted to participate to this study and donate their blood. Finally, we thank Becton Dickinson for their generous gift of ACD-A tube for blood punction.

REFERENCES

1. Pilewski JM, Frizzell RA. Role of CFTR in airway disease. Physiol Rev 1999;79(1Suppl):S215-S255.

2. Souza HA, Nogueira KS, Matos AP, Vieira RP, Riedi CA, Rosário NA, Telles FQ, Costa LM. Early microbial colonization of cystic fibrosis patients identified by neonatal screening, with emphasis on Staphylococcus aureus. J Pediatr (Rio J) 2006;82(5):377-82.

 Tirouvanziam R, de Bentzmann S, Hubeau C, Hinnrasky J, Jacquot J, Peault B, Puchelle E. Inflammation and infection in naive human cystic fibrosis airway grafts. Am J Respir Cell Mol Biol 2000;23(2):121-7.

4. Llewelyn M, Cohen J. Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. Lancet Infect Dis 2002;2(3):156-62.

5. Moraes TJ, Plumb J, Martin R, Vachon E, Cherepanov V, Koh A, Loeve C, Jongstra-Bilen J, Zurawska JH, Kus JV, Burrows LL, Grinstein S, Downey GP. Abnormalities in the pulmonary innate immune system in cystic fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol 2006;34(3):364-74.

6. Blackwell TS, Stecenko AA, Christman JW. Dysregulated NF-kappaB activation in cystic fibrosis: evidence for a primary inflammatory disorder. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001;281(1):L69-L70.

7. Stecenko AA, King G, Torii K, Breyer RM, Dworski R, Blackwell TS, Christman JW, Brigham KL. Dysregulated cytokine production in human cystic fibrosis bronchial epithelial cells. Inflammation 2001;25(3):145-55.

8. Verhaeghe C, Delbecque K, de Leval L, Oury C, Bours V. Early inflammation in the airways of a cystic fibrosis foetus. J Cyst Fibros 2007; 6(4):304-8.

9. Muhlebach MS, Noah TL. Endotoxin activity and inflammatory markers in the airways of young patients with cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 2002 ;165: 911–915.

Muhlebach MS, Reed W, Noah TL. Quantitative cytokine gene expression in CF airway.
Pediatr Pulmonol 2004 ;37: 393–399.

11. Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 1995 ;151: 1075–1082.

12. Marguet C, Jouen-Boedes F, Dean TP, Warner JO. Bronchoalveolar cell profiles in children with asthma, infantile wheeze, chronic cough, or cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 1999;159(5 Pt 1):1533-40.

13. Moss RB. Lymphocytes in cystic fibrosis lung disease: a tale of two immunities. Clin Exp Immunol 2004;135(3):358-60.

14. Hubeau C, Lorenzato M, Couetil JP, Hubert D, Dusser D, Puchelle E, Gaillard D.Quantitative analysis of inflammatory cells infiltrating the cystic fibrosis airway mucosa. ClinExp Immunol 2001;124(1):69-76.

15. Escotte S, Al Alam D, Le Naour R, Puchelle E, Guenounou M, Gangloff SC. T cell chemotaxis and chemokine release after Staphylococcus aureus interaction with polarized airway epithelium. Am J Respir Cell Mol Biol 2006;34(3):348-54.

16. Merten MD, Kammouni W, Renaud W, Birg F, Mattei MG, Figarella C. A transformed human tracheal gland cell line, MM-39 that retains serous secretory functions. Am J Respir Cell Mol Biol 1996;15(4):520-8.

17. Kammouni W, Moreau B, Becq F, Saleh A, Pavirani A, Figarella C, Merten MD. A cystic fibrosis tracheal gland cell line, CF-KM4. Correction by adenovirus-mediated CFTR gene transfer. Am J Respir Cell Mol Biol 1999;20(4):684-91.

18. Taub DD, Key ML, Clark D, Turcovski-Corrales SM. Chemotaxis of T lymphocytes on extracellular matrix proteins. Analysis of the in vitro method to quantitate chemotaxis of human T cells. J Immunol Methods 1995;184(2):187-98.

19. Lamkhioued B, Renzi PM, Abi-Younes S, Garcia-Zepada EA, Allakhverdi Z, Ghaffar O, Rothenberg MD, Luster AD, Hamid Q. Increased expression of Eotaxin in Bronchoalveolar Lavage and airways of asthmatics contributes to the chemotaxis of eosinophils to the site of inflammation. J Immunol 1997;159:4593-4601.

20. Moreilhon C, Gras D, Hologne C, Bajolet O, Cottrez F, Magnone V, Merten M, Groux H, Puchelle E, Barbry P. Live Staphylococcus aureus and bacterial soluble factors induce different transcriptional responses in human airway cells. Physiol Genomics 2005;20(3):244-55.

21. Da Silva MC, Zahm JM, Gras D, Bajolet O, Abely M, Hinnrasky J, Milliot M, de Assis MC, Hologne C, Bonnet N, Merten M, Plotkowski MC, Puchelle E. Dynamic interaction between airway epithelial cells and Staphylococcus aureus. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004;287(3):L543-L551.

22. Carrabino S, Carpani D, Livraghi A, Di Cicco M, Costantini D, Copreni E, Colombo C, Conese M. Dysregulated interleukin-8 secretion and NF-kappaB activity in human cystic fibrosis nasal epithelial cells. J Cyst Fibros 2006;5(2):113-9.

23. Tabary O, Escotte S, Couetil JP, Hubert D, Dusser D, Puchelle E, Jacquot J. High susceptibility for cystic fibrosis human airway gland cells to produce IL-8 through the I kappa B kinase alpha pathway in response to extracellular NaCl content. J Immunol 2000;164(6):3377-84.

24. Verhaeghe C, Remouchamps C, Hennuy B, Vanderplasschen A, Chariot A, Tabruyn SP, Oury C, Bours V. Role of IKK and ERK pathways in intrinsic inflammation of cystic fibrosis airways. Biochem Pharmacol 2007;73(12):1982-94.

25. Reiniger N, Ichikawa JK, Pier GB. Influence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator on gene expression in response to Pseudomonas aeruginosa infection of human bronchial epithelial cells. Infect Immun 2005;73(10):6822-30.

119

26. Virella-Lowell I, Herlihy JD, Liu B, Lopez C, Cruz P, Muller C, Baker HV, Flotte TR. Effects of CFTR, interleukin-10 and Pseudomonas aeruginosa on gene expression profiles in a CF bronchial epithelial cell line. Mol Ther 2004;10:562-73.

27. Hartl D, Griese M, Kappler M, Zissel G, Reinhardt D, Rebhan C, Schendel DJ, Krauss-Etschmann S. Pulmonary T(H)2 response in Pseudomonas aeruginosa-infected patients with cystic fibrosis. J Allergy Clin Immunol 2006; 117(1):204-211.

28. Vukmanovic-Stejic M, Vyas B, Gorak-Stolinska P, Noble A, Kemeny DM. Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. Blood 2000; 95:231.

29. Katchar K, Eklund A, Grunewald J. Expression of Th1 markers by lung accumulated T cells in pulmonary sarcoidosis. J Inten Med 2003;254:564-571.

30. Campbell JJ, Brightling CE, Symon FA, Qin S, Murphy KE, Hodge M, Andrew DP, Wu L, Butcher EC, Wardlaw AJ. Expression of chemokine receptors by lung T cells from normal and asthmatic subjects. J Immunol 2001;166:2842.

31. Pignatti P, Brunetti G, Moretto D, Yacoub MR, Fiori M, Balbi B , Balestrino A, Cervio G, Nava S, Moscato G. Role of the chemokine receptors CXCR3 and CCR4 in human pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 2006; 173(3):310-7.

32. Takata H, Tomiyama H, Fujiwara M, Kobayashi N and Takiguchi M. Expression of chemokine receptor CXCR1 on Human Effector CD8+ T cells. J Immunol 2004; 173: 2231-2235.

33. Francis NJ, Jacobson MR, Lloyd CM, Sabroe I, Durham SR, Till SJ. CXCR1+CD4+ T cells in Human Allergic Disease. J Immunol 2004;172: 268-273.

Footnotes

This work and A.D. were supported by the French Cystic Fibrosis Association "Vaincre La

Mucoviscidose" (VLM).

Les principaux résultats de cette étude sont les suivants :

- A l'état basal, la production d'IL-8, GROα, MCP-1, MIG et MIP-3β par les cellules épithéliales bronchiques CF est plus importante que leur production par les cellules épithéliales bronchiques non-CF.
- Suite à l'infection par *S. aureus*, une augmentation de la sécrétion d'IL-8, GROα, MCP-1, MIG et MIP-3β par les cellules épithéliales bronchiques non-CF est observée.
- L'infection par S. aureus n'a pas d'effet sur la sécrétion d'IL-8, GROα et MCP-1 par les cellules épithéliales bronchiques CF, tandis qu'elle induit une augmentation de la sécrétion de MIG et MIP-3β par ces mêmes cellules.
- S. aureus induit une augmentation du chimiotactisme des LT non-CF et CF vis-à-vis des surnageants de culture apicaux et basolatéraux des cellules épithéliales bronchiques non-CF.
- S. aureus n'a pas d'effet sur le chimiotactisme des LT non-CF et CF vis-à-vis des surnageants de culture apicaux et basolatéraux des cellules épithéliales bronchiques CF.
- 6) Le chimiotactisme des LT primaires de patients CF vis-à-vis de l'IL-8 recombinante et des surnageants des cellules non-CF et CF est plus important que le chimiotactisme des LT primaires de donneurs non-CF.
- 7) L'inhibition de l'IL-8 dans les surnageants apicaux et basolatéraux de culture des cellules épithéliales bronchiques non-CF et CF induit une inhibition d'au moins 60 % du chimiotactisme des LT non-CF et CF.
- Le nombre de LT CD3⁺CXCR1⁺ est plus élevé dans les LT de patients CF par rapport aux LT de donneurs sains.

Nos résultats suggèrent que l'expression accrue de CXCR1 sur les LT CF semble responsable du chimiotactisme important de ces LT, contribuant ainsi à la mise en place d'une réponse inflammatoire excessive et persistante. Cette réponse serait indépendante de la présence de *S. aureus*. L'IL-8 et son récepteur le CXCR1 pourraient donc jouer un rôle fondamental dans le recrutement pulmonaire des LT chez les patients CF avant toute infection.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Durant ces dernières décennies, des avancées importantes ont été réalisées dans la compréhension des interactions entre les pathogènes et les cellules hôtes. La caractérisaion des mécanismes liés à la défense de l'hôte et à la mise en place de la réponse immunitaire constitue un facteur important dans la compréhension de ces interactions et l'éradication du pathogène. Outre les défenses physiques et mécaniques, la défense de l'hôte se traduit par la sécrétion de médiateurs inflammatoires tels que les cytokines et les chimiokines, qui induisent le recrutement de cellules immunitaires vers le site de l'inflammation. Dans certaines pathologies pulmonaires comme la mucoviscidose, les cellules immunitaires, telles que les neutrophiles et les lymphocytes T, sont retrouvées en grandes quantités dans les LBA des patients et jouent un rôle important dans les mécanismes de défense.

Bien que *S. aureus* soit un pathogène majeur de l'appareil respiratoire humain, les conséquences de ses interactions avec l'épithélium respiratoire sur la réponse de l'hôte et la mise en place d'une réponse immune ont été très peu étudiées. En revanche, son implication dans les infections observées dans la mucoviscidose est largement reconnue.

Les principaux objectifs de ce travail visaient à déterminer, lors d'une infection précoce, les conséquences de l'interaction entre *S. aureus* et des cellules épithéliales glandulaires bronchiques normales et mucoviscidosiques.

Dans des modèles murins de la mucoviscidose, différentes mutations du gène cftr ont été étudiées dans le cadre d'infections avec *P. aeruginosa* ou, plus rarement *S. aureus*. Or, très peu de mutations du gène *cftr* entraînent avant infection chez la souris, les modifications pulmonaires observées chez les patients CF. De plus au niveau pulmonaire, lors d'une infection à *S. aureus*, ce dernier interagit directement avec la surface apicale de l'épithélium respiratoire. Ainsi dans le but de mimer *in vitro* les infections de l'épithélium respiratoire par *S. aureus*, nous avons développé un modèle de culture liquide-liquide, en double chambre. La polarité et l'intégrité des monocouches ont été vérifiées grâce à la sécrétion de SLPI (marqueur de polarité) et la mesure de la résistance transépithéliale (TER). La sécrétion de SLPI était plus importante dans les surnageants de culture apicaux par rapport aux surnageants basolatéraux, dans les deux types cellulaires, non-CF et CF. Ceci indique que les monocouches sont bien polarisées. Arrivées à confluence et avant toute infection, les monocouches de cellules CF présentaient une TER légèrement plus basse que celle des cellules non-CF. En présence, en apical, de 2 concentrations différentes de *S. aureus* (3.3 x 10^7 et 10^8 CFU/mL) la TER des cellules non-CF reste stable jusqu'à 3h d'interaction avec *S.*

aureus, et aucune bactérie n'est détectée dans les surnageants cellulaires basolatéraux. Par contre, au-delà de 3h une diminution de la TER est observée avec les 2 concentrations de *S. aureus*, et des bactéries sont retrouvées dans les surnageants basolatéraux. Ces résultats sont en accord avec une étude récente qui montre une diminution de la TER et une détection de bactéries dans les surnageants basolatéraux après interaction des cellules épithéliales 16HBE avec *S. pneumoniae* (Beisswenger *et al.*, 2007). Par contre, la TER des cellules épithéliales CF reste stable durant les 6h d'interaction avec *S. aureus*. Comme si *S. aureus* n'était pas aussi virulent sur les cellules CF par rapport aux cellules non-CF. Une hypothèse serait que la reconnaissance de *S. aureus* par les TLR2 des cellules épithéliales ne se fasse pas avec la même intensité sur les 2 épithéliums. Cette hypothèse repose sur 3 points :

- L'étude de Beisswenger *et al.* qui a également montré que l'interaction du LTA de S. *aureus* avec les cellules épithéliales Caco-2 exprimant le TLR2 entraîne une diminution de la TER, et qui suggère que cette diminution de la TER est TLR2-dépendante.
- L'expression de TLR2 à la surface des cellules épithéliales varie, les cellules épithéliales CF possèdent une expression plus faible de TLR2 que les cellules épithéliales non-CF (Hauber *et al.*, 2005).
- L'expression des ARN de TLR2 augmente dans les cellules non-CF après 3h d'interaction avec les facteurs de virulence de *S. aureus*, mais n'augmente qu'après 6h d'interaction avec *S. aureus* dans les cellules CF (thèse de Delphine Gras, résultats non publiés).

L'intégrité de la barrière épithéliale constitue un élément essentiel de la défense des cellules contre les agressions bactériennes. Pour pouvoir étudier l'impact d'une infection qui débute sur un épithélium intègre, le temps d'interaction de 3h a été choisi ainsi q'une quantité de bactéries en phase de croissance de 3.3 x 10⁷ CFU/mL, soit 30 bactéries pour 1 cellule. En effet, l'exposition des cellules épithéliales à 10⁸ CFU/mL de *S. aureus* entraîne une adhérence et une internalisation importantes des bactéries après 3h d'interaction avec *S. aureus*, mais aussi une nécrose cellulaire (Moreilhon *et al.*, 2005). La survenue des phénomènes inflammatoires est encore, à l'heure actuelle, très controversée dans la mucoviscidose. L'inflammation précède-t-elle ou non l'infection? Les médiateurs proinflammatoires sont-ils déjà sur le site ou sont-ils produits après l'infection? Nos résultats confortent l'hypothèse d'une inflammation qui précède toute infection. Dans notre modèle, à l'état basal les cellules épithéliales CF produisent des quantités plus importantes de chimiokines que les cellules épithéliales glandulaires bronchiques bronchiques bronchiques non-CF tant dans les

surnageants apicaux que dans les surnageants basolatéraux. Ces résultats sont en concordance avec plusieurs études cliniques qui montrent l'existence d'une inflammation pulmonaire chez les fœtus CF avant toute infection ou la présence de quantités élevées d'IL-8 et de neutrophiles dans les LBA de patients CF ne présentant aucune infection. Il a été également montré que les LBA de patients CF contiennent des quantités plus élevées de MCP-1 et MIG que les LBA de sujets contrôles (Hartl *et al.*, 2006). Cependant, quelques études contradictoires ne montrent pas de différence significative du taux de l'IL-8 entre cellules épithéliales CF et non-CF (Becker *et al.*, 2004 ; Reiniger *et al.*, 2005 ; Wiszniewski *et al.*, 2006), ou même un taux de l'IL-8 sécrétée par les cellules CF inférieur à celui des cellules non-CF (Massengale *et al.*, 1999). Il a été également décrit que les LBA de patients CF et non-CF présentaient des quantités équivalentes de GROα (Wyatt *et al.*, 2000). Outre une concentration plus importante de chimiokines pour les cellules CF par rapport aux cellules non-CF, nous avons aussi montré l'existence d'un gradient décroissant de chimiokines apical/basolatéral pour les deux types de cellules non-CF et CF.

Même si S. aureus est le premier pathogène à coloniser le tractus respiratoire des patients CF, la plupart des études dans la mucoviscidose ont porté sur les infections à P. aeruginosa. Certaines études rapportent des quantités plus élevées d'IL-8, MCP-1 et MIG dans les LBA de patients CF infectés par P. aeruginosa par rapport aux LBA de patients CF non infectés par P. aeruginosa ou de sujets non-CF (Hartl et al., 2006). D'autres études montrent que l'infection des cellules épithéliales bronchiques CF par P. aeruginosa n'a pas d'effet sur la sécrétion d'IL-8 et de GRO α alors qu'il y a une augmentation de la production d'IL-8 et de GROα par les cellules épithéliales bronchiques non-CF (Reiniger et al., 2005). Lors de l'infection par S. aureus, nous avons montré que cette bactérie à gram positif induisait une augmentation de la sécrétion de l'IL-8, GRO α et MCP-1 par les cellules épithéliales glandulaires bronchiques non-CF, alors qu'elle n'a pas d'effet sur la sécrétion de ces mêmes chimiokines par les cellules épithéliales CF. Ceci corrobore le fait que le phénomène inflammatoire dans la mucoviscidose précède les infections mais aussi que les cellules CF ne répondent pas à l'infection. Durant l'infection à S. aureus, la TER et la production de chimiokines des cellules épithéliales CF restent stables contrairement aux cellules non-CF. Ceci suggère que les cellules épithéliales CF sont moins sensibles à S. aureus que les cellules épithéliales non-CF.

Le chimiotactisme des neutrophiles, macrophages et lymphocytes, joue un rôle important dans la mise en place de la réponse immunitaire. Les chimiokines sont les principales responsables de ce chimiotactisme. Les cellules épithéliales bronchiques sont capables de sécréter un grand nombre de chimiokines, certaines à des concentrations plus importantes que d'autres ; par exemple IL-8, GRO α et NAP-2 sont les chimiokines les plus sécrétées par les 2 types cellulaires CF et non-CF. S. aureus induit une augmentation de la production de certaines d'entre elles par les cellules non-CF alors qu'il n'y a pas de variation de production par les cellules CF. S. aureus est connu pour induire le chimiotactisme des neutrophiles et des macrophages qui doivent servir à son élimination rapide, mais l'effet de S. aureus sur le chimiotactisme des LT n'avait jamais été étudié à notre connaissance. Cependant, il a été montré que l'entérotoxine B de S. aureus induit une accumulation de LT dans les LBA de patients, associée à des quantités importantes d'IL-4 (Herz *et al.*, 1999). Nos études de chimiotactisme ont montré que les LT circulants humains purifiés avaient une capacité de migration plus importante vers les surnageants apicaux et basolatéraux des cellules épithéliales non-CF lorsque celles-ci étaient stimulées par S. aureus. L'utilisation d'anticorps neutralisant de l'IL-8, une chimiokine qui attire principalement les neutrophiles, a permis de montrer que cette chimiokine joue un rôle important (60-80%) dans la migration des LT non-CF vers les surnageants apicaux et basolatéraux. Ainsi grâce au gradient de concentration en chimiokines autour de l'épithélium, gradient qui s'accentue lors d'une infection à S. aureus, les LT peuvent arriver jusqu'au site de l'infection avant que l'intégrité de l'épithélium ne soit rompue. L'épithélium non-CF joue donc bien un rôle de senseur. A l'inverse, même si dans les surnageants de culture de cellules CF, l'IL-8 est aussi le premier facteur chimiotactique vis-à-vis des LT CF, la présence de S. aureus n'induit pas une augmentation du chimiotactisme des LT CF. L'épithélium CF qui est déjà dans un état proinflammatoire et attire déjà les LT avant toute infection, ne semble pas jouer son rôle de senseur vis-à-vis de S. aureus.

La capacité des cellules à migrer vers un chimioattractant est étroitement liée à la présence du récepteur de ce chimioattractant sur la cellule. L'IL-8 jouant un rôle prépondérant dans le chimiotactisme des LT, l'expression de ses récepteurs CXCR1 et CXCR2 a été analysée sur les LT. CXCR2 est très faiblement exprimé à la surface des LT CF ou non-CF. Par contre, CXCR1 est exprimé lorsque les LT non-CF sont en contact des surnageants de culture des cellules épithéliales non-CF. Cette expression augmente au contact des surnageants des cellules non-CF stimulées par *S. aureus*. Les LT non-CF deviennent donc plus sensibles à l'IL-8, ce qui permet d'amplifier leur chimiotactisme (augmentation de l'IL-8 dans les
surnageants et de son récepteur sur les LT). En ce qui concerne les LT CF, leur chimiotactisme de base est plus important que celui des LT non-CF et il n'est pas accentué vis-à-vis des surnageants des cellules épithéliales CF stimulées par *S. aureus*. Ceci peut s'expliquer d'une part par le fait que la quantité sécrétée d'IL-8 est identique en absence ou en présence de *S. aureus* et d'autre part par le fait que le nombre de LT CXCR1⁺ est plus important dans les LT CF par rapport aux LT non-CF. Ces résultats suggèrent que le CXCR1 et l'IL-8 jouent un rôle important dans l'accumulation des LT dans les poumons de patients CF avant toute infection et donc dans la pathogènese de la mucoviscidose.

La plupart des pathologies respiratoires est caractérisée par une polarisation préférentielle de type Th1 ou Th2. Par exemple, les LT des poumons de patients atteints de la BPCO ou de la sarcoïdose pulmonaire expriment à leur surface le récepteur de l'IP-10, le CXCR3, récepteur qui correspond à un profil Th1 (Katchar et al., 2003). Par contre les LT de LBA de patients asthmatiques expriment préférentiellement les récepteurs CCR3 et CCR4, marqueur du profil Th2 (Campbell et al., 2001). Très peu d'études se sont intéressées à l'expression des récepteurs des chimiokines sur les LT dans la mucoviscidose. Cependant, il a été reporté que la quantité de LT CD4⁺CCR4⁺ (Th2) dans les LBA de patients CF infectés par P. aeruginosa était significativement plus élevée que dans les LBA de témoins ou de patients CF non-infectés par P. aeruginosa (Hartl et al., 2005). En se basant sur les sécrétions de cytokines et de chimiokines, plusieurs études supportent la prédominance Th2 dans la mucoviscidose (Moser et al., 2005; Allard et al., 2006). Dans notre étude, nous avons montré que le nombre de LT CCR7⁺ et CXCR3⁺ est plus élevé dans les LT de donneurs sains non-CF par rapport aux LT de patients CF. Un nombre plus élevé de LT CXCR3⁺ est également retrouvé dans d'autres pathologies pulmonaires telles que la fibrose pulmonaire idiopathique (Pignatti et al., 2006a). D'autre part, Il a été montré que l'expression de CXCR1 et CXCR2 sur les neutrophiles de sang péripherique diminuent chez les patients asthmatiques et chez les patients atteints de la BPCO par rapport à des sujets sains. De plus, l'expression de CXCR1 et CXCR2 sur les neutrophiles issus d'expectorations induites de patients BPCO et de patients asthmatiques est plus faible que leur expression sur les neutrophiles du sang périphérique de ces mêmes patients (Pignatti et al., 2006b). Afin de compléter nos résultats, il serait intéressant d'étudier l'expression des récepteurs des chimiokines et notamment le CXCR1 sur des LT et des neutrophiles provenant de LBA de patients CF, mais aussi d'analyser le profil Th1, Th2, Treg et Th17 de ces LT.

Les patients atteints de la CF présentent une augmentation de la prévalence pour des pathologies médiées par les LT CD4⁺ de type Th2 comme l'asthme ou l'aspergillose bronchopulmonaire allergique (Skov et al., 2005). Les mécanismes responsables de cette prévalence ne sont pas totalement élucidés. Les cellules dendritiques (CDs) représentent un élément clé dans la différentiation des lymphocytes Th1 et Th2. Les CDs capturent l'antigène sur le site de l'inflammation et, sous l'influence du microenvironnement, elles maturent et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires pour induire une polarisation des lymphocytes T naïfs (Banchereau et al., 2000). Plusieurs études montrent que, dans des conditions particulières comme l'allergie, les CDs peuvent être pré-conditionnées et induire une réponse Th2 inadaptée (Charbonnier et al., 2003 ; Hammad et al., 2001). Plusieurs études récentes ont également mis en évidence que la cellule épithéliale peut pré-conditionner la CDs, directement ou via la production de facteurs solubles (Chieppa et al., 2006; Liu et al., 2006). Des facteurs de virulence de S. aureus comme l'entérotoxine B sont capables de stimuler les CDs dérivées de monocytes (MoCDs) par l'intermédiaire du TLR2 et d'induire leur maturation. Ces MoCDs ne produisent pas d'IL-12 et induisent une réponse Th2 (Mandron et al., 2006). Ainsi, les modifications du microenvironnement alvéolaire induites par l'interaction précoce de S. aureus avec les cellules épithéliales pourraient conditionner à la fois les CDs présentes sur le site et celles recrutées par la suite et participer à la dérégulation de la réponse T. Au vu de ces différents éléments, nous proposons d'étudier, à plus long terme, le rôle des CDs dans le contexte particulier de la mucoviscidose. Il a été montré que la mutation du gène cftr pouvait modifier les fonctions des cellules T (Allard et al., 2006), en revanche à ce jour il existe peu de données sur les CDs dans la mucoviscidose. Afin de déterminer l'importance de l'infection précoce de l'épithélium respiratoire par S. aureus dans le pré-conditionnement des MoCDs, l'effet des facteurs solubles libérés par les cellules épithéliales infectées par S. aureus sera évaluée sur la différenciation et la maturation des CDs ainsi que sur leur capacité à polariser les cellules T dans un contexte physiologique mais aussi dans le contexte de la mucoviscidose.

Tout au long de notre étude, nous avons utilisé la souche de référence de *S. aureus* 8325-4. Dans les infections respiratoires, on assiste actuellement à une émergence de souches de SARM. Dans la mucoviscidose par exemple, des souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline sont isolées des poumons de patients à hauteur de 14,6%. Il nous paraît donc intéressant de valider nos résultats en utilisant d'autres souches de *S. aureus* comme les souches SARM ou des souches cliniques isolées de patients CF.

Nous avons montré que les cellules épithéliales CF sont moins sensibles à *S. aureus* 8325-4 que les cellules épithéliales non-CF. Pour élucider ce point, l'étude des récepteurs impliqués dans la reconnaissance de *S. aureus* par les cellules épithéliales serait envisageable. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées parmi lesquelles l'existence d'une dérégulation de l'expression des récepteurs de *S. aureus* sur les cellules épithéliales CF. Cette hypothèse reste cependant à confirmer puisque les données de la littérature concernant les récepteurs de *S. aureus* sont très contradictoires, notamment pour le TLR2 (Hauber *et al.* 2005; Muir *et al.*, 2004; Firoved *et al.*, 2004). D'autres récepteurs peuvent aussi participer à la pathogénèse de *S. aureus* comme le TNFR1 qui est exprimé plus fortement sur les cellules épithéliales CF que sur les cellules non-CF (Sajjan *et al.*, 2007).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ACKERMAN MJ, CLAPHAM DE.

Ion channels--basic science and clinical disease. N Engl J Med 1997; 336(22):1575-1586.

AFZALI B, LOMBARDI G, LECHLER RI, LORD GM.

The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. Clin Exp Immunol 2007; 148(1):32-46.

AGERBERTH B, GRUNEWALD J, CASTANOS-VELEZ E, OLSSON B, JORNVALL H, WIGZELL H et al.

Antibacterial components in bronchoalveolar lavage fluid from healthy individuals and sarcoidosis patients.

Am J Respir Crit Care Med 1999; 160(1):283-290.

AKABAS MH.

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Structure and function of an epithelial chloride channel. L Piol Cham 2000: 275(6):2720, 2722

J Biol Chem 2000; 275(6):3729-3732.

AKIRA S, TAKEDA K.

Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol 2004; 4(7):499-511.

AKIRA S, UEMATSU S, TAKEUCHI O.

Pathogen recognition and innate immunity. Cell 2006; 124(4):783-801.

ALLARD JB, POYNTER ME, MARR KA, COHN L, RINCON M, WHITTAKER LA.

Aspergillus fumigatus generates an enhanced Th2-biased immune response in mice with defective cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. J Immunol 2006; 177(8):5186-5194.

ARMSTRONG DS, HOOK SM, JAMSEN KM, NIXON GM, CARZINO R, CARLIN JB et al.

Lower airway inflammation in infants with cystic fibrosis detected by newborn screening. Pediatr Pulmonol 2005; 40(6):500-510.

ASHITANI J, MUKAE H, NAKAZATO M, IHI T, MASHIMOTO H, KADOTA J et al. Elevated concentrations of defensins in bronchoalveolar lavage fluid in diffuse panbronchiolitis.

Eur Respir J 1998; 11(1):104-111.

ASHITANI J, MUKAE H, HIRATSUKA T, NAKAZATO M, KUMAMOTO K, MATSUKURA S.

Plasma and BAL fluid concentrations of antimicrobial peptides in patients with Mycobacterium avium-intracellulare infection. Chest 2001; 119(4):1131-1137.

ASHITANI J, MUKAE H, HIRATSUKA T, NAKAZATO M, KUMAMOTO K, MATSUKURA S.

Elevated levels of alpha-defensins in plasma and BAL fluid of patients with active pulmonary tuberculosis.

Chest 2002; 121(2):519-526.

AYERS MM, JEFFERY PK.

Proliferation and differentiation in mammalian airway epithelium. Eur Respir J 1988; 1(1):58-80.

AZZAWI M, BRADLEY B, JEFFERY PK, FREW AJ, WARDLAW AJ, KNOWLES G et al.

Identification of activated T lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma.

Am Rev Respir Dis 1990; 142(6 Pt 1):1407-1413.

AZZAWI M, JOHNSTON PW, MAJUMDAR S, KAY AB, JEFFERY PK.

T lymphocytes and activated eosinophils in airway mucosa in fatal asthma and cystic fibrosis. Am Rev Respir Dis 1992; 145(6):1477-1482.

BAECHER-ALLAN C, HAFLER DA.

Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. Immunol Rev 2006; 212:203-216.

BAGGIOLINI M.

Chemokines in pathology and medicine. J Intern Med 2001; 250(2):91-104.

BALDWIN ET, WEBER IT, ST CHARLES R, XUAN JC, APPELLA E, YAMADA M et al.

Crystal structure of interleukin 8: symbiosis of NMR and crystallography. Proc Natl Acad Sci U S A 1991; 88(2):502-506.

BALDWIN F.

Basal cells in human bronchial epithelium. Anat Rec 1994; 238(3):360-367.

BALS R, WEINER DJ, MEEGALLA RL, ACCURSO F, WILSON JM. Salt-independent abnormality of antimicrobial activity in cystic fibrosis airway surface fluid. Am J Respir Cell Mol Biol 2001; 25(1):21-25.

BALS R, HIEMSTRA PS.

Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. Eur Respir J 2004; 23(2):327-333.

BANCHEREAU J, STEINMAN RM.

Dendritic cells and the control of immunity. Nature 1998; 392(6673):245-252.

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.

BAO X, LIU T, SPETCH L, KOLLI D, GAROFALO RP, CASOLA A.

Airway epithelial cell response to human metapneumovirus infection. Virology 2007; 368(1):91-101.

BARCZYK A, PIERZCHALA W, SOZANSKA E.

Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine. Respir Med 2003; 97(6):726-733.

BARNES PJ, COSIO MG.

Characterization of T lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease. PLoS Med 2004; 1(1):e20.

BEAR CE, LI CH, KARTNER N, BRIDGES RJ, JENSEN TJ, RAMJEESINGH M et al.

Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR).

Cell 1992; 68(4):809-818.

BECKER MN, SAUER MS, MUHLEBACH MS, HIRSH AJ, WU Q, VERGHESE MW et al.

Cytokine secretion by cystic fibrosis airway epithelial cells. Am J Respir Crit Care Med 2004; 169(5):645-653.

BEISSWENGER C, COYNE CB, SHCHEPETOV M, WEISER JN.

Role of p38 MAP kinase and transforming growth factor-beta signaling in transepithelial migration of invasive bacterial pathogens. J Biol Chem 2007; 282(39):28700-28708.

BELKAID Y, BLANK RB, SUFFIA I.

Natural regulatory T cells and parasites: a common quest for host homeostasis. Immunol Rev 2006; 212:287-300.

BERTRAND CA, FRIZZELL RA.

The role of regulated CFTR trafficking in epithelial secretion. Am J Physiol Cell Physiol 2003; 285(1):C1-18.

BHAKDI S, TRANUM-JENSEN J.

Alpha-toxin of Staphylococcus aureus. Microbiol Rev 1991; 55(4):733-751.

BOBADILLA JL, MACEK M, JR., FINE JP, FARRELL PM.

Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. Hum Mutat 2002; 19(6):575-606.

BOERS JE, DEN BROK JL, KOUDSTAAL J, ARENDS JW, THUNNISSEN FB.

Number and proliferation of neuroendocrine cells in normal human airway epithelium. Am J Respir Crit Care Med 1996; 154(3 Pt 1):758-763.

BOISMENU R, HAVRAN WL.

An innate view of gamma delta T cells. Curr Opin Immunol 1997; 9(1):57-63.

BOST KL, BENTO JL, PETTY CC, SCHRUM LW, HUDSON MC, MARRIOTT I.

Monocyte chemoattractant protein-1 expression by osteoblasts following infection with Staphylococcus aureus or Salmonella.

J Interferon Cytokine Res 2001; 21(5):297-304.

BOUCHER RC.

New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. Eur Respir J 2004; 23(1):146-158.

BOUTTEN A, DEHOUX MS, SETA N, OSTINELLI J, VENEMBRE P, CRESTANI B et al.

Compartmentalized IL-8 and elastase release within the human lung in unilateral pneumonia. Am J Respir Crit Care Med 1996; 153(1):336-342.

BOWES D, CLARK AE, CORRIN B.

Ultrastructural localisation of lactoferrin and glycoprotein in human bronchial glands. Thorax 1981; 36(2):108-115.

BRAZOVA J, SEDIVA A, POSPISILOVA D, VAVROVA V, POHUNEK P, MACEK M, JR. et al.

Differential cytokine profile in children with cystic fibrosis. Clin Immunol 2005; 115(2):210-215.

BREEZE RG, WHEELDON EB.

The cells of the pulmonary airways. Am Rev Respir Dis 1977; 116(4):705-777.

BREUER R, ZAJICEK G, CHRISTENSEN TG, LUCEY EC, SNIDER GL.

Cell kinetics of normal adult hamster bronchial epithelium in the steady state. Am J Respir Cell Mol Biol 1990; 2(1):51-58.

BROWN GD.

Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. Nat Rev Immunol 2006; 6(1):33-43.

BRUGNONI D, AIRO P, ROSSI G, BETTINARDI A, SIMON HU, GARZA L et al. A case of hypereosinophilic syndrome is associated with the expansion of a CD3-CD4+ T-cell population able to secrete large amounts of interleukin-5. Blood 1996; 87(4):1416-1422.

BRUHL H, CIHAK J, SCHNEIDER MA, PLACHY J, RUPP T, WENZEL I et al.

Dual role of CCR2 during initiation and progression of collagen-induced arthritis: evidence for regulatory activity of CCR2+ T cells. J Immunol 2004; 172(2):890-898.

BUETTNER M, MEYER B, SCHRECK S, NIEDOBITEK G.

Expression of RANTES and MCP-1 in epithelial cells is regulated via LMP1 and CD40. Int J Cancer 2007; 121(12):2703-2710.

BUSSE WW, LEMANSKE RF, JR.

Asthma. N Engl J Med 2001; 344(5):350-362.

CAMPBELL JJ, BRIGHTLING CE, SYMON FA, QIN S, MURPHY KE, HODGE M et al.

Expression of chemokine receptors by lung T cells from normal and asthmatic subjects. J Immunol 2001; 166(4):2842-2848.

CARRABINO S, CARPANI D, LIVRAGHI A, DI CICCO M, COSTANTINI D, COPRENI E et al.

Dysregulated interleukin-8 secretion and NF-kappaB activity in human cystic fibrosis nasal epithelial cells.

J Cyst Fibros 2006; 5(2):113-119.

CASAULTA C, SCHONI MH, WEICHEL M, CRAMERI R, JUTEL M, DAIGLE I et al.

IL-10 controls Aspergillus fumigatus- and Pseudomonas aeruginosa-specific T-cell response in cystic fibrosis.

Pediatr Res 2003; 53(2):313-319.

CASSATELLA MA.

Interferon-gamma inhibits the lipopolysaccharide-induced macrophage inflammatory protein-1 alpha gene transcription in human neutrophils. Immunol Lett 1996; 49(1-2):79-82.

CHARBONNIER AS, HAMMAD H, GOSSET P, STEWART GA, ALKAN S, TONNEL AB et al.

Der p 1-pulsed myeloid and plasmacytoid dendritic cells from house dust mite-sensitized allergic patients dysregulate the T cell response. J Leukoc Biol 2003; 73(1):91-99.

CHEN Y, THAI P, ZHAO YH, HO YS, DESOUZA MM, WU R.

Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop.

J Biol Chem 2003; 278(19):17036-17043.

CHIEPPA M, RESCIGNO M, HUANG AY, GERMAIN RN.

Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement.

J Exp Med 2006; 203(13):2841-2852.

CHILVERS MA, O'CALLAGHAN C.

Analysis of ciliary beat pattern and beat frequency using digital high speed imaging: comparison with the photomultiplier and photodiode methods. Thorax 2000; 55(4):314-317.

CHRISTENSEN TG, BLANCHARD GC, NOLLEY G, HAYES JA.

Ultrastructural localization of endogenous peroxidase in the lower respiratory tract of the guinea pig.

Cell Tissue Res 1981; 214(2):407-415.

CHRISTENSEN TG, HAYES JA.

Endogenous peroxidase in the conducting airways of hamsters: morphologic evidence of synthesis and secretion.

Am Rev Respir Dis 1982; 125(3):341-346.

CLARK EA, LANE PJ.

Regulation of human B-cell activation and adhesion. Annu Rev Immunol 1991; 9:97-127.

CLORE GM, APPELLA E, YAMADA M, MATSUSHIMA K, GRONENBORN AM.

Three-dimensional structure of interleukin 8 in solution. Biochemistry 1990; 29(7):1689-1696.

COLLINS PD, MARLEAU S, GRIFFITHS-JOHNSON DA, JOSE PJ, WILLIAMS TJ.

Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo.

J Exp Med 1995; 182(4):1169-1174.

CORAUX C, KILEZTKY C, POLETTE M, HINNRASKY J, ZAHM JM, DEVILLIER P et al.

Airway epithelial integrity is protected by a long-acting beta2-adrenergic receptor agonist. Am J Respir Cell Mol Biol 2004; 30(5):605-612.

COTTREZ F, HURST SD, COFFMAN RL, GROUX H.

T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo. J Immunol 2000; 165(9):4848-4853.

CRAPO JD, BARRY BE, GEHR P, BACHOFEN M, WEIBEL ER.

Cell number and cell characteristics of the normal human lung. Am Rev Respir Dis 1982; 126(2):332-337.

CRAWFORD I, MALONEY PC, ZEITLIN PL, GUGGINO WB, HYDE SC, TURLEY H et al.

Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR. Proc Natl Acad Sci U S A 1991; 88(20):9262-9266.

CRIBIER B, PREVOST G, COUPPIE P, FINCK-BARBANCON V, GROSSHANS E, PIEMONT Y.

Staphylococcus aureus leukocidin: a new virulence factor in cutaneous infections? An epidemiological and experimental study. Dermatology 1992; 185(3):175-180.

Derinatorogy 1992, 100(0),110 100.

CROSS CE, VAN D, V, O'NEILL CA, LOUIE S, HALLIWELL B.

Oxidants, antioxidants, and respiratory tract lining fluids. Environ Health Perspect 1994; 102 Suppl 10:185-191.

CURIEL TJ, COUKOS G, ZOU L, ALVAREZ X, CHENG P, MOTTRAM P et al.

Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. Nat Med 2004; 10(9):942-949.

CUTHBERT AW.

Cystic fibrosis. 4. Abnormalities of airway epithelial function and the implications of the discovery of the cystic fibrosis gene. Thorax 1991: 46(2):124-130.

CUTZ E, JACKSON A.

Neuroepithelial bodies as airway oxygen sensors. Respir Physiol 1999; 115(2):201-214.

DA SILVA MC, ZAHM JM, GRAS D, BAJOLET O, ABELY M, HINNRASKY J et al.

Dynamic interaction between airway epithelial cells and Staphylococcus aureus. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004; 287(3):L543-L551.

DAKIN CJ, NUMA AH, WANG H, MORTON JR, VERTZYAS CC, HENRY RL.

Inflammation, infection, and pulmonary function in infants and young children with cystic fibrosis.

Am J Respir Crit Care Med 2002; 165(7):904-910.

DAVIES JC.

Gene and cell therapy for cystic fibrosis. Paediatr Respir Rev 2006; 7 Suppl 1:S163-S165.

DE WATER R, WILLEMS LN, VAN MUIJEN GN, FRANKEN C, FRANSEN JA, DIJKMAN JH et al.

Ultrastructural localization of bronchial antileukoprotease in central and peripheral human airways by a gold-labeling technique using monoclonal antibodies. Am Rev Respir Dis 1986; 133(5):882-890.

DEAN M, ALLIKMETS R.

Evolution of ATP-binding cassette transporter genes. Curr Opin Genet Dev 1995; 5(6):779-785.

DESSING MC, VAN DER SLUIJS KF, FLORQUIN S, VAN DER PT.

Monocyte chemoattractant protein 1 contributes to an adequate immune response in influenza pneumonia.

Clin Immunol 2007.

DEVINE DA.

Antimicrobial peptides in defence of the oral and respiratory tracts. Mol Immunol 2003; 40(7):431-443.

DIAMOND G, LEGARDA D, RYAN LK.

The innate immune response of the respiratory epithelium. Immunol Rev 2000; 173:27-38.

DIECKMANN D, PLOTTNER H, BERCHTOLD S, BERGER T, SCHULER G.

Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood.

J Exp Med 2001; 193(11):1303-1310.

DIECKMANN D, BRUETT CH, PLOETTNER H, LUTZ MB, SCHULER G.

Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. J Exp Med 2002; 196(2):247-253.

DIMANGO E, RATNER AJ, BRYAN R, TABIBI S, PRINCE A.

Activation of NF-kappaB by adherent Pseudomonas aeruginosa in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells. J Clin Invest 1998; 101(11):2598-2605.

DONG C, FLAVELL RA.

Th1 and Th2 cells. Curr Opin Hematol 2001; 8(1):47-51.

DONNELLY GM, HAACK DG, HEIRD CS.

Tracheal epithelium: cell kinetics and differentiation in normal rat tissue. Cell Tissue Kinet 1982; 15(2):119-130.

DOWNER R, ROCHE F, PARK PW, MECHAM RP, 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(1):243-250.

DUBIN PJ, MCALLISTER F, KOLLS JK.

Is cystic fibrosis a TH17 disease? Inflamm Res 2007; 56(6):221-227.

DURAND SH, FLACHER V, ROMEAS A, CARROUEL F, COLOMB E, VINCENT C et al.

Lipoteichoic acid increases TLR and functional chemokine expression while reducing dentin formation in in vitro differentiated human odontoblasts. J Immunol 2006; 176(5):2880-2887.

ELIASSON M, FRICK IM, COLLIN M, SORENSEN OE, BJORCK L, EGESTEN A.

M1 protein of Streptococcus pyogenes increases production of the antibacterial CXC chemokine MIG/CXCL9 in pharyngeal epithelial cells. Microb Pathog 2007; 43(5-6):224-233.

ELLEFSEN P, TOS M.

Goblet cells in the human trachea. Quantitative studies of normal tracheae. Anat Anz 1972; 130(5):501-520.

FALK MM.

Connexin-specific distribution within gap junctions revealed in living cells. J Cell Sci 2000; 113 (Pt 22):4109-4120.

FALK MM.

Cell-free synthesis for analyzing the membrane integration, oligomerization, and assembly characteristics of gap junction connexins. Methods 2000; 20(2):165-179.

FEHRENBACH H, SCHMIEDL A, WAHLERS T, HIRT SW, BRASCH F, RIEMANN D et al.

Morphometric characterisation of the fine structure of human type II pneumocytes. Anat Rec 1995; 243(1):49-62.

FERRICK DA, SCHRENZEL MD, MULVANIA T, HSIEH B, FERLIN WG, LEPPER H.

Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo. Nature 1995; 373(6511):255-257.

FIROVED AM, ORNATOWSKI W, DERETIC V.

Microarray analysis reveals induction of lipoprotein genes in mucoid Pseudomonas aeruginosa: implications for inflammation in cystic fibrosis. Infect Immun 2004; 72(9):5012-5018.

FONTENOT JD, GAVIN MA, RUDENSKY AY.

Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. Nat Immunol 2003; 4(4):330-336.

FOSTER TJ, MCDEVITT D.

Surface-associated proteins of Staphylococcus aureus: their possible roles in virulence. FEMS Microbiol Lett 1994; 118(3):199-205.

FOURNIER B, PHILPOTT DJ.

Recognition of Staphylococcus aureus by the innate immune system. Clin Microbiol Rev 2005; 18(3):521-540.

FOURNIER M, LEBARGY F, LE ROY LF, LENORMAND E, PARIENTE R.

Intraepithelial T-lymphocyte subsets in the airways of normal subjects and of patients with chronic bronchitis.

Am Rev Respir Dis 1989; 140(3):737-742.

FRANKEN C, KRAMPS JA, MEYER CJ, DIJKMAN JH.

Localization of a low molecular weight protease inhibitor in the respiratory tract. Bull Eur Physiopathol Respir 1980; 16 Suppl:231-236.

FRANKEN C, MEIJER CJ, DIJKMAN JH.

Tissue distribution of antileukoprotease and lysozyme in humans. J Histochem Cytochem 1989; 37(4):493-498.

GADSBY DC, NAIRN AC.

Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis. Physiol Rev 1999; 79(1 Suppl):S77-S107.

GAILLARD D, RUOCCO S, LALLEMAND A, DALEMANS W, HINNRASKY J, PUCHELLE E.

Immunohistochemical localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human fetal airway and digestive mucosa. Pediatr Res 1994; 36(2):137-143.

GARCIA JR, JAUMANN F, SCHULZ S, KRAUSE A, RODRIGUEZ-JIMENEZ J, FORSSMANN U et al.

Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of Xenopus oocytes and the induction of macrophage chemoattraction.

Cell Tissue Res 2001; 306(2):257-264.

GARLANDA C, BOTTAZZI B, BASTONE A, MANTOVANI A.

Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility.

Annu Rev Immunol 2005; 23:337-366.

GARROD D, CHIDGEY M, NORTH A.

Desmosomes: differentiation, development, dynamics and disease. Curr Opin Cell Biol 1996; 8(5):670-678.

GARROD DR.

Desmosomes and hemidesmosomes. Curr Opin Cell Biol 1993; 5(1):30-40.

GASQUE P.

Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. Mol Immunol 2004; 41(11):1089-1098.

GAY NJ, GANGLOFF M.

Structure and function of Toll receptors and their ligands. Annu Rev Biochem 2007; 76:141-165.

GIBSON RL, BURNS JL, RAMSEY BW.

Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 2003; 168(8):918-951.

GIRARDIN SE, BONECA IG, CARNEIRO LA, ANTIGNAC A, JEHANNO M, VIALA J et al.

Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. Science 2003; 300(5625):1584-1587.

GIRARDIN SE, BONECA IG, VIALA J, CHAMAILLARD M, LABIGNE A, THOMAS G et al.

Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. J Biol Chem 2003; 278(11):8869-8872.

GIRARDIN SE, PHILPOTT DJ.

Mini-review: the role of peptidoglycan recognition in innate immunity. Eur J Immunol 2004; 34(7):1777-1782.

GLIMCHER LH, MURPHY KM.

Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. Genes Dev 2000; 14(14):1693-1711.

GODFREY RW, SEVERS NJ, JEFFERY PK.

Freeze-fracture morphology and quantification of human bronchial epithelial tight junctions. Am J Respir Cell Mol Biol 1992; 6(4):453-458.

GOERKE C, KRANING K, STERN M, DORING G, BOTZENHART K, WOLZ C.

Molecular epidemiology of community-acquired Staphylococcus aureus in families with and without cystic fibrosis patients.

J Infect Dis 2000; 181(3):984-989.

GOMEZ MI, LEE A, REDDY B, MUIR A, SOONG G, PITT A et al.

Staphylococcus aureus protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1.

Nat Med 2004; 10(8):842-848.

GONZALO JA, LLOYD CM, KREMER L, FINGER E, MARTINEZ A, SIEGELMAN MH et al.

Eosinophil recruitment to the lung in a murine model of allergic inflammation. The role of T cells, chemokines, and adhesion receptors. J Clin Invest 1996; 98(10):2332-2345.

GOODMAN MR, LINK DW, BROWN WR, NAKANE PK.

Ultrastructural evidence of transport of secretory IgA across bronchial epithelium. Am Rev Respir Dis 1981; 123(1):115-119.

GOSS CH, BURNS JL.

Exacerbations in cystic fibrosis. 1: Epidemiology and pathogenesis. Thorax 2007; 62(4):360-367.

GRAVELINE R, SEGURA M, RADZIOCH D, GOTTSCHALK M.

TLR2-dependent recognition of Streptococcus suis is modulated by the presence of capsular polysaccharide which modifies macrophage responsiveness. Int Immunol 2007; 19(4):375-389.

GREEN KJ, JONES JC.

Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components. FASEB J 1996; 10(8):871-881.

GREENWOOD MF, HOLLAND P.

The mammalian respiratory tract surface. A scanning electron microscopic study. Lab Invest 1972; 27(3):296-304.

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(6652):737-742.

HAMMAD H, CHARBONNIER AS, DUEZ C, JACQUET A, STEWART GA, TONNEL AB et al.

Th2 polarization by Der p 1--pulsed monocyte-derived dendritic cells is due to the allergic status of the donors.

Blood 2001; 98(4):1135-1141.

HAPPEL KI, ZHENG M, YOUNG E, QUINTON LJ, LOCKHART E, RAMSAY AJ et al.

Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to Klebsiella pneumoniae infection.

J Immunol 2003; 170(9):4432-4436.

HARDER J, MEYER-HOFFERT U, TERAN LM, SCHWICHTENBERG L, BARTELS J, MAUNE S et al.

Mucoid Pseudomonas aeruginosa, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human betadefensin-2 in respiratory epithelia.

Am J Respir Cell Mol Biol 2000; 22(6):714-721.

HARDER J, BARTELS J, CHRISTOPHERS E, SCHRODER JM.

Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic.

J Biol Chem 2001; 276(8):5707-5713.

HARRIS TO, GROSSMAN D, KAPPLER JW, MARRACK P, RICH RR, BETLEY MJ.

Lack of complete correlation between emetic and T-cell-stimulatory activities of staphylococcal enterotoxins.

Infect Immun 1993; 61(8):3175-3183.

HARTL D, GRIESE M, KAPPLER M, ZISSEL G, REINHARDT D, REBHAN C et al. Pulmonary T(H)2 response in Pseudomonas aeruginosa-infected patients with cystic fibrosis. J Allergy Clin Immunol 2006; 117(1):204-211.

HAUBER HP, TULIC MK, TSICOPOULOS A, WALLAERT B, OLIVENSTEIN R, DAIGNEAULT P et al.

Toll-like receptors 4 and 2 expression in the bronchial mucosa of patients with cystic fibrosis. Can Respir J 2005; 12(1):13-18.

HEBERT CA, VITANGCOL RV, BAKER JB.

Scanning mutagenesis of interleukin-8 identifies a cluster of residues required for receptor binding.

J Biol Chem 1991; 266(28):18989-18994.

HECZKO PB, HOFFLER U, KASPROWICZ A, PULVERER G.

Quantitative studies of the flora of the nasal vestibule in relation to nasal carriage of Staphylococcus aureus.

J Med Microbiol 1981; 14(3):233-241.

HEIJERMAN H.

Infection and inflammation in cystic fibrosis: a short review. J Cyst Fibros 2005; 4 Suppl 2:3-5.

HELLINGS PW, HENS G, MEYTS I, BULLENS D, VANOIRBEEK J, GEVAERT P et al.

Aggravation of bronchial eosinophilia in mice by nasal and bronchial exposure to Staphylococcus aureus enterotoxin B. Clin Exp Allergy 2006; 36(8):1063-1071.

HEMELAERS L, LOUIS R.

[Eotaxin: an important chemokine in asthma]. Rev Med Liege 2006; 61(4):223-226.

HENDERSON WR, JR., CHI EY.

Degranulation of cystic fibrosis nasal polyp mast cells. J Pathol 1992; 166(4):395-404.

HERZ U, RUCKERT R, WOLLENHAUPT K, TSCHERNIG T, NEUHAUS-STEINMETZ U, PABST R et al.

Airway exposure to bacterial superantigen (SEB) induces lymphocyte-dependent airway inflammation associated with increased airway responsiveness--a model for non-allergic asthma.

Eur J Immunol 1999; 29(3):1021-1031.

HESS C, MEANS TK, AUTISSIER P, WOODBERRY T, ALTFELD M, ADDO MM et al.

IL-8 responsiveness defines a subset of CD8 T cells poised to kill. Blood 2004; 104(12):3463-3471.

HIEMSTRA PS.

Epithelial antimicrobial peptides and proteins: their role in host defence and inflammation. Paediatr Respir Rev 2001; 2(4):306-310.

HIRATSUKA T, NAKAZATO M, DATE Y, ASHITANI J, MINEMATSU T, CHINO N et al.

Identification of human beta-defensin-2 in respiratory tract and plasma and its increase in bacterial pneumonia.

Biochem Biophys Res Commun 1998; 249(3):943-947.

HIRATSUKA T, MUKAE H, IIBOSHI H, ASHITANI J, NABESHIMA K, MINEMATSU T et al.

Increased concentrations of human beta-defensins in plasma and bronchoalveolar lavage fluid of patients with diffuse panbronchiolitis.

Thorax 2003; 58(5):425-430.

HOFFMAN RM, CLAYPOOL WD, KATYAL SL, SINGH G, ROGERS RM, DAUBER JH.

Augmentation of rat alveolar macrophage migration by surfactant protein. Am Rev Respir Dis 1987; 135(6):1358-1362.

HOLGATE ST, LACKIE P, WILSON S, ROCHE W, DAVIES D.

Bronchial epithelium as a key regulator of airway allergen sensitization and remodeling in asthma.

Am J Respir Crit Care Med 2000; 162(3 Pt 2):S113-S117.

HOLT PG.

Antigen presentation in the lung. Am J Respir Crit Care Med 2000; 162(4 Pt 2):S151-S156.

HOOVER DM, RAJASHANKAR KR, BLUMENTHAL R, PURI A, OPPENHEIM JJ, CHERTOV O et al.

The structure of human beta-defensin-2 shows evidence of higher order oligomerization. J Biol Chem 2000; 275(42):32911-32918.

HORI S, NOMURA T, SAKAGUCHI S.

Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science 2003; 299(5609):1057-1061.

HOSHINO H, LAAN M, SJOSTRAND M, LOTVALL J, SKOOGH BE, LINDEN A.

Increased elastase and myeloperoxidase activity associated with neutrophil recruitment by IL-17 in airways in vivo.

J Allergy Clin Immunol 2000; 105(1 Pt 1):143-149.

HUBEAU C, LORENZATO M, COUETIL JP, HUBERT D, DUSSER D, PUCHELLE E et al.

Quantitative analysis of inflammatory cells infiltrating the cystic fibrosis airway mucosa. Clin Exp Immunol 2001a; 124(1):69-76.

HUBEAU C, PUCHELLE E, GAILLARD D.

Distinct pattern of immune cell population in the lung of human fetuses with cystic fibrosis. J Allergy Clin Immunol 2001b; 108(4):524-529.

HUBEAU C, LE NAOUR R, ABELY M, HINNRASKY J, GUENOUNOU M, GAILLARD D et al.

Dysregulation of IL-2 and IL-8 production in circulating T lymphocytes from young cystic fibrosis patients.

Clin Exp Immunol 2004; 135(3):528-534.

INOHARA N, KOSEKI T, DEL PESO L, HU Y, YEE C, CHEN S et al.

Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. J Biol Chem 1999; 274(21):14560-14567.

ISLER P, NICOD LP

Effect of lipopolysaccharide and superantigens on T-cell activation by lung macrophages and dendritic cells.

Eur Respir Rev, 2000,10,133-138.

JARRY TM, CHEUNG AL.

Staphylococcus aureus escapes more efficiently from the phagosome of a cystic fibrosis bronchial epithelial cell line than from its normal counterpart. Infect Immun 2006; 74(5):2568-2577.

JEFFERY PK, LI D.

Airway mucosa: secretory cells, mucus and mucin genes. Eur Respir J 1997; 10(7):1655-1662.

JOSE PJ, GRIFFITHS-JOHNSON DA, COLLINS PD, WALSH DT, MOQBEL R, TOTTY NF et al.

Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation.

J Exp Med 1994; 179(3):881-887.

KAMMOUNI W, FIGARELLA C, MARCHAND S, MERTEN M.

Altered cytokine production by cystic fibrosis tracheal gland serous cells. Infect Immun 1997; 65(12):5176-5183.

KAMMOUNI W, MOREAU B, BECQ F, SALEH A, PAVIRANI A, FIGARELLA C et al.

A cystic fibrosis tracheal gland cell line, CF-KM4. Correction by adenovirus-mediated CFTR gene transfer.

Am J Respir Cell Mol Biol 1999; 20(4):684-691.

KATCHAR K, EKLUND A, GRUNEWALD J.

Expression of Th1 markers by lung accumulated T cells in pulmonary sarcoidosis. J Intern Med 2003; 254(6):564-571.

KAWAGUCHI M, KOKUBU F, KUGA H, TOMITA T, MATSUKURA S, KADOKURA M et al.

Expression of eotaxin by normal airway epithelial cells after influenza virus A infection. Int Arch Allergy Immunol 2000; 122 Suppl 1:44-49.

KAWAI T, AKIRA S.

TLR signaling. Semin Immunol 2007; 19(1):24-32.

KELLERMANN SA, HUDAK S, OLDHAM ER, LIU YJ, MCEVOY LM.

The CC chemokine receptor-7 ligands 6Ckine and macrophage inflammatory protein-3 beta are potent chemoattractants for in vitro- and in vivo-derived dendritic cells. J Immunol 1999; 162(7):3859-3864.

KEREM B, ROMMENS JM, BUCHANAN JA, MARKIEWICZ D, COX TK, CHAKRAVARTI A et al.

Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science 1989; 245(4922):1073-1080.

KIDD P.

Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. Altern Med Rev 2003; 8(3):223-246.

KIM CH, PELUS LM, WHITE JR, BROXMEYER HE.

Differential chemotactic behavior of developing T cells in response to thymic chemokines. Blood 1998a; 91(12):4434-4443.

KIM CH, PELUS LM, WHITE JR, APPLEBAUM E, JOHANSON K, BROXMEYER HE.

CK beta-11/macrophage inflammatory protein-3 beta/EBI1-ligand chemokine is an efficacious chemoattractant for T and B cells. J Immunol 1998b; 160(5):2418-2424.

KIM CH, KUNKEL EJ, BOISVERT J, JOHNSTON B, CAMPBELL JJ, GENOVESE MC et al.

Bonzo/CXCR6 expression defines type 1-polarized T-cell subsets with extralymphoid tissue homing potential.

J Clin Invest 2001; 107(5):595-601.

KING M, RUBIN BK.

Mucus-controlling agents: past and present. Respir Care Clin N Am 1999; 5(4):575-594.

KITAURA M, NAKAJIMA T, IMAI T, HARADA S, COMBADIERE C, TIFFANY HL et al.

Molecular cloning of human eotaxin, an eosinophil-selective CC chemokine, and identification of a specific eosinophil eotaxin receptor, CC chemokine receptor 3. J Biol Chem 1996; 271(13):7725-7730.

KLUYTMANS JA, MOUTON JW, IJZERMAN EP, VANDENBROUCKE-GRAULS CM, MAAT AW, WAGENVOORT JH et al.

Nasal carriage of Staphylococcus aureus as a major risk factor for wound infections after cardiac surgery.

J Infect Dis 1995; 171(1):216-219.

KNIGHT DA, HOLGATE ST.

The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. Respirology 2003; 8(4):432-446.

KNOWLES M, GATZY J, BOUCHER R.

Relative ion permeability of normal and cystic fibrosis nasal epithelium. J Clin Invest 1983; 71(5):1410-1417.

KNOWLES MR, BOUCHER RC.

Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. J Clin Invest 2002; 109(5):571-577.

KNUEFERMANN P, SAKATA Y, BAKER JS, HUANG CH, SEKIGUCHI K, HARDARSON HS et al.

Toll-like receptor 2 mediates Staphylococcus aureus-induced myocardial dysfunction and cytokine production in the heart.

Circulation 2004; 110(24):3693-3698.

KOCZULLA AR, BALS R.

Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential. Drugs 2003; 63(4):389-406.

KOHWIWATTANAGUN J, KAWAMURA I, FUJIMURA T, MITSUYAMA M.

Mycobacterial mammalian cell entry protein 1A (Mce1A)-mediated adherence enhances the chemokine production by A549 alveolar epithelial cells. Microbiol Immunol 2007; 51(2):253-261.

KONSTAN MW, CHENG PW, BOAT TF.

A comparative study of lysozyme and its secretion by tracheal epithelium. Exp Lung Res 1982; 3(2):175-181.

KRAFT M., MARTIN RJ., WILSON S, DJUKANOVIC R, HOLGATE ST.

Lymphocyte and eosinophil influx into alveolar tissue in nocturnal asthma. Am J Respir Crit Care Med, 1999, 159:228-234.

KRAUSS RD, BUBIEN JK, DRUMM ML, ZHENG T, PEIPER SC, COLLINS FS et al.

Transfection of wild-type CFTR into cystic fibrosis lymphocytes restores chloride conductance at G1 of the cell cycle.

EMBO J 1992; 11(3):875-883.

KRISANAPRAKORNKIT S, KIMBALL JR, DALE BA.

Regulation of human beta-defensin-2 in gingival epithelial cells: the involvement of mitogenactivated protein kinase pathways, but not the NF-kappaB transcription factor family. J Immunol 2002; 168(1):316-324.

KUNKEL EJ, CAMPBELL JJ, HARALDSEN G, PAN J, BOISVERT J, ROBERTS AI et al.

Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: Epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. J Exp Med 2000; 192(5):761-768.

LAAN M, CUI ZH, HOSHINO H, LOTVALL J, SJOSTRAND M, GRUENERT DC et al.

Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. J Immunol 1999; 162(4):2347-2352.

LAAN M, PALMBERG L, LARSSON K, LINDEN A.

Free, soluble interleukin-17 protein during severe inflammation in human airways. Eur Respir J 2002; 19(3):534-537.

LAHAT N, RIVLIN J, IANCU TC.

Functional immunoregulatory T-cell abnormalities in cystic fibrosis patients. J Clin Immunol 1989; 9(4):287-295.

LALLEMAND JY, STOVEN V, ANNEREAU JP, BOUCHER J, BLANQUET S, BARTHE J et al.

Induction by antitumoral drugs of proteins that functionally complement CFTR: a novel therapy for cystic fibrosis? Lancet 1997; 350(9079):711-712.

LAMBLIN G, AUBERT JP, PERINI JM, KLEIN A, PORCHET N, DEGAND P et al.

Human respiratory mucins. Eur Respir J 1992; 5(2):247-256.

LARSSON BM, LARSSON K, MALMBERG P, PALMBERG L.

Gram positive bacteria induce IL-6 and IL-8 production in human alveolar macrophages and epithelial cells.

Inflammation 1999; 23(3):217-230.

LEE I, WANG L, WELLS AD, DORF ME, OZKAYNAK E, HANCOCK WW.

Recruitment of Foxp3+ T regulatory cells mediating allograft tolerance depends on the CCR4 chemokine receptor.

J Exp Med 2005; 201(7):1037-1044.

LEE MS, KIM YJ.

Pattern-recognition receptor signaling initiated from extracellular, membrane, and cytoplasmic space.

Mol Cells 2007; 23(1):1-10.

LESPRIT E, ESCUDIER E, ROGER G, PRULIERE V, LENOIR G, REINERT P et al.

Characterization of inflammatory reaction in upper airways of cystic fibrosis patients. Histol Histopathol 2000; 15(2):395-402.

LEUBE RE, RUSTAD TJ.

Squamous cell metaplasia in the human lung: molecular characteristics of epithelial stratification.

Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 1991; 61(4):227-253.

LIM HW, HILLSAMER P, KIM CH.

Regulatory T cells can migrate to follicles upon T cell activation and suppress GC-Th cells and GC-Th cell-driven B cell responses.

J Clin Invest 2004; 114(11):1640-1649.

LIU C, XU Z, GUPTA D, DZIARSKI R.

Peptidoglycan recognition proteins: a novel family of four human innate immunity pattern recognition molecules.

J Biol Chem 2001; 276(37):34686-34694.

LIU YJ, SOUMELIS V, WATANABE N, ITO T, WANG YH, MALEFYT RW et al.

TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation.

Annu Rev Immunol 2007; 25:193-219.

LLEWELYN M, COHEN J.

Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. Lancet Infect Dis 2002; 2(3):156-162.

LOUSSOUARN G, DEMOLOMBE S, MOHAMMAD-PANAH R, ESCANDE D, BARO I.

Expression of CFTR controls cAMP-dependent activation of epithelial K+ currents. Am J Physiol 1996; 271(5 Pt 1):C1565-C1573.

LOWY FD.

Staphylococcus aureus infections. N Engl J Med 1998; 339(8):520-532.

LUO Y, CHEN X, O'DONNELL MA.

Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) induces human CC- and CXCchemokines in vitro and in vivo. Clin Exp Immunol 2007; 147(2):370-378.

LUSTER AD.

Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. N Engl J Med 1998; 338(7):436-445.

LUTHER SA, CYSTER JG.

Chemokines as regulators of T cell differentiation. Nat Immunol 2001; 2(2):102-107.

MACHEN TE.

Innate immune response in CF airway epithelia: hyperinflammatory? Am J Physiol Cell Physiol 2006; 291(2):C218-C230.

MACKAY CR.

Chemokines: what chemokine is that? Curr Biol 1997; 7(6):R384-R386.

MADARA JL, DHARMSATHAPHORN K.

Occluding junction structure-function relationships in a cultured epithelial monolayer. J Cell Biol 1985; 101(6):2124-2133.

MALL M, GRUBB BR, HARKEMA JR, O'NEAL WK, BOUCHER RC.

Increased airway epithelial Na+ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. Nat Med 2004; 10(5):487-493.

MANDRON M, ARIES MF, BREHM RD, TRANTER HS, ACHARYA KR, CHARVERON M et al.

Human dendritic cells conditioned with Staphylococcus aureus enterotoxin B promote TH2 cell polarization.

J Allergy Clin Immunol 2006; 117(5):1141-1147.

MANTOVANI A, BONECCHI R, LOCATI M.

Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. Nat Rev Immunol 2006; 6(12):907-918.

MARRACK P, KAPPLER J.

The staphylococcal enterotoxins and their relatives. Science 1990; 248(4956):705-711.

MASHBURN LM, JETT AM, AKINS DR, WHITELEY M.

Staphylococcus aureus serves as an iron source for Pseudomonas aeruginosa during in vivo coculture.

J Bacteriol 2005; 187(2):554-566.

MASSENGALE AR, QUINN F, JR., YANKASKAS J, WEISSMAN D, MCCLELLAN WT, CUFF C et al.

Reduced interleukin-8 production by cystic fibrosis airway epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol 1999; 20(5):1073-1080.

MASSION PP, INOUE H, RICHMAN-EISENSTAT J, GRUNBERGER D, JORENS PG, HOUSSET B et al.

Novel Pseudomonas product stimulates interleukin-8 production in airway epithelial cells in vitro.

J Clin Invest 1994; 93(1):26-32.

MATSUI H, DAVIS CW, TARRAN R, BOUCHER RC.

Osmotic water permeabilities of cultured, well-differentiated normal and cystic fibrosis airway epithelia.

J Clin Invest 2000; 105(10):1419-1427.

MATSUI K, WIROTESANGTHONG M, NISHIKAWA A.

Percutaneous application of peptidoglycan from Staphylococcus aureus induces eosinophil infiltration in mouse skin.

Clin Exp Allergy 2007; 37(4):615-622.

MCELVANEY NG, NAKAMURA H, BIRRER P, HEBERT CA, WONG WL, ALPHONSO M et al.

Modulation of airway inflammation in cystic fibrosis. In vivo suppression of interleukin-8 levels on the respiratory epithelial surface by aerosolization of recombinant secretory leukoprotease inhibitor.

J Clin Invest 1992; 90(4):1296-1301.

MCNAMARA PS, FLANAGAN BF, BALDWIN LM, NEWLAND P, HART CA, SMYTH RL.

Interleukin 9 production in the lungs of infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis.

Lancet 2004; 363(9414):1031-1037.

MCWILLIAM AS, NAPOLI S, MARSH AM, PEMPER FL, NELSON DJ, PIMM CL et al.

Dendritic cells are recruited into the airway epithelium during the inflammatory response to a broad spectrum of stimuli.

J Exp Med 1996; 184(6):2429-2432.

MEDZHITOV R.

Recognition of microorganisms and activation of the immune response. Nature 2007; 449(7164):819-826.

MERCER RR, RUSSELL ML, ROGGLI VL, CRAPO JD.

Cell number and distribution in human and rat airways. Am J Respir Cell Mol Biol 1994; 10(6):613-624.

MERCURIO AR, RHODIN JA.

An electron microscopic study on the type I pneumocyte in the cat: differentiation. Am J Anat 1976; 146(3):255-271.

MERTEN MD, KAMMOUNI W, RENAUD W, BIRG F, MATTEI MG, FIGARELLA C.

A transformed human tracheal gland cell line, MM-39, that retains serous secretory functions. Am J Respir Cell Mol Biol 1996; 15(4):520-528.

MESSAGE SD, JOHNSTON SL.

Host defense function of the airway epithelium in health and disease: clinical background. J Leukoc Biol 2004; 75(1):5-17.

MEYRICK B, REID L.

Ultrastructure of cells in the human bronchial submucosal glands. J Anat 1970; 107(Pt 2):281-299.

MIAJLOVIC H, LOUGHMAN A, BRENNAN M, COX D, FOSTER TJ.

Both complement- and fibrinogen-dependent mechanisms contribute to platelet aggregation mediated by Staphylococcus aureus clumping factor B. Infect Immun 2007; 75(7):3335-3343.

MICHEL T, REICHHART JM, HOFFMANN JA, ROYET J.

Drosophila Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein.

Nature 2001; 414(6865):756-759.

MIYAMOTO M, PRAUSE O, SJOSTRAND M, LAAN M, LOTVALL J, LINDEN A.

Endogenous IL-17 as a mediator of neutrophil recruitment caused by endotoxin exposure in mouse airways.

J Immunol 2003; 170(9):4665-4672.

MIYASAKA M, TANAKA T.

Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. Nat Rev Immunol 2004; 4(5):360-370.

MOLET S, HAMID Q, DAVOINE F, NUTKU E, TAHA R, PAGE N et al.

IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines.

J Allergy Clin Immunol 2001; 108(3):430-438.

MORAES TJ, PLUMB J, MARTIN R, VACHON E, CHEREPANOV V, KOH A et al.

Abnormalities in the pulmonary innate immune system in cystic fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol 2006; 34(3):364-374.

MOREILHON C, GRAS D, HOLOGNE C, BAJOLET O, COTTREZ F, MAGNONE V et al.

Live Staphylococcus aureus and bacterial soluble factors induce different transcriptional responses in human airway cells.

Physiol Genomics 2005; 20(3):244-255.

MORRIS AP, CUNNINGHAM SA, TOUSSON A, BENOS DJ, FRIZZELL RA.

Polarization-dependent apical membrane CFTR targeting underlies cAMP-stimulated Cl-secretion in epithelial cells.

Am J Physiol 1994; 266(1 Pt 1):C254-C268.

MOSER C, JENSEN PO, KOBAYASHI O, HOUGEN HP, SONG Z, RYGAARD J et al.

Improved outcome of chronic Pseudomonas aeruginosa lung infection is associated with induction of a Th1-dominated cytokine response.

Clin Exp Immunol 2002; 127(2):206-213.

MOSER C, JENSEN PO, PRESSLER T, FREDERIKSEN B, LANNG S, KHARAZMI A et al.

Serum concentrations of GM-CSF and G-CSF correlate with the Th1/Th2 cytokine response in cystic fibrosis patients with chronic Pseudomonas aeruginosa lung infection. APMIS 2005; 113(6):400-409.

MOSMANN TR, CHERWINSKI H, BOND MW, GIEDLIN MA, COFFMAN RL.

Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.

J Immunol 1986; 136(7):2348-2357.

MUIR A, SOONG G, SOKOL S, REDDY B, GOMEZ MI, VAN HEECKEREN A et al.

Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol 2004; 30(6):777-783.

MUKAE H, IIBOSHI H, NAKAZATO M, HIRATSUKA T, TOKOJIMA M, ABE K et al.

Raised plasma concentrations of alpha-defensins in patients with idiopathic pulmonary fibrosis.

Thorax 2002; 57(7):623-628.

NADEL JA.

Regulation of airway secretions. Chest 1985; 87(1 Suppl):111S-113S.

NAKAJIMA M, KAWANAMI O, JIN E, GHAZIZADEH M, HONDA M, ASANO G et al.

Immunohistochemical and ultrastructural studies of basal cells, Clara cells and bronchiolar cuboidal cells in normal human airways. Pathol Int 1998; 48(12):944-953.

NAKAMURA K, KITANI A, STROBER W.

Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. J Exp Med 2001; 194(5):629-644.

NAKAMURA K, KITANI A, FUSS I, PEDERSEN A, HARADA N, NAWATA H et al.

TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice.

J Immunol 2004; 172(2):834-842.

NELSON PJ, PATTISON JM, KRENSKY AM.

Gene expression of RANTES. Methods Enzymol 1997; 287:148-162.

O'CONNELL DP, NANAVATY T, MCDEVITT D, GURUSIDDAPPA S, HOOK M, FOSTER TJ.

The fibrinogen-binding MSCRAMM (clumping factor) of Staphylococcus aureus has a Ca2+dependent inhibitory site.

J Biol Chem 1998; 273(12):6821-6829.

O'NEIL DA, PORTER EM, ELEWAUT D, ANDERSON GM, ECKMANN L, GANZ T et al.

Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium.

J Immunol 1999; 163(12):6718-6724.

O'NEILL SJ, LESPERANCE E, KLASS DJ.

Human lung lavage surfactant enhances staphylococcal phagocytosis by alveolar macrophages.

Am Rev Respir Dis 1984; 130(6):1177-1179.

O'SHAUGHNESSY TC, ANSARI TW, BARNES NC, JEFFERY PK.

Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1.

Am J Respir Crit Care Med 1997; 155(3):852-857.

OKADA T, NGO VN, EKLAND EH, FORSTER R, LIPP M, LITTMAN DR et al.

Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. J Exp Med 2002; 196(1):65-75.

OPPENHEIM JJ, BIRAGYN A, KWAK LW, YANG D.

Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. Ann Rheum Dis 2003; 62 Suppl 2:ii17-ii21.

ORENSTEIN DM, WINNIE GB, ALTMAN H.

Cystic fibrosis: a 2002 update. J Pediatr 2002; 140(2):156-164.

PALMQVIST N, FOSTER T, TARKOWSKI A, JOSEFSSON E.

Protein A is a virulence factor in Staphylococcus aureus arthritis and septic death. Microb Pathog 2002; 33(5):239-249.

PANYUTICH AV, HIEMSTRA PS, VAN WETERING S, GANZ T.

Human neutrophil defensin and serpins form complexes and inactivate each other. Am J Respir Cell Mol Biol 1995; 12(3):351-357.

PAPADAKIS KA, PREHN J, NELSON V, CHENG L, BINDER SW, PONATH PD et al.

The role of thymus-expressed chemokine and its receptor CCR9 on lymphocytes in the regional specialization of the mucosal immune system. J Immunol 2000; 165(9):5069-5076.

PERFETTO B, DONNARUMMA G, CRISCUOLO D, PAOLETTI I, GRIMALDI E, TUFANO MA et al.

Bacterial components induce cytokine and intercellular adhesion molecules-1 and activate transcription factors in dermal fibroblasts.

Res Microbiol 2003; 154(5):337-344.

PHILLIPS R, AGER A.

Activation of pertussis toxin-sensitive CXCL12 (SDF-1) receptors mediates transendothelial migration of T lymphocytes across lymph node high endothelial cells. Eur J Immunol 2002; 32(3):837-847.

PIER GB, GROUT M, ZAIDI TS, GOLDBERG JB.

How mutant CFTR may contribute to Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 1996; 154(4 Pt 2):S175-S182.

PIER GB, GROUT M, ZAIDI TS.

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of Pseudomonas aeruginosa from the lung. Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94(22):12088-12093.

PIGNATTI P, MOSCATO G, CASARINI S, DELMASTRO M, POPPA M, BRUNETTI G et al.

Downmodulation of CXCL8/IL-8 receptors on neutrophils after recruitment in the airways. J Allergy Clin Immunol 2005; 115(1):88-94.

PIGNATTI P, BRUNETTI G, MORETTO D, YACOUB MR, FIORI M, BALBI B et al.

Role of the chemokine receptors CXCR3 and CCR4 in human pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 2006; 173(3):310-317.

PLOPPER CG.

Comparative morphologic features of bronchiolar epithelial cells. The Clara cell. Am Rev Respir Dis 1983; 128(2 Pt 2):S37-S41.

PLOTKOWSKI MC, DE BENTZMANN S, PEREIRA SH, ZAHM JM, BAJOLET-LAUDINAT O, ROGER P et al.

Pseudomonas aeruginosa internalization by human epithelial respiratory cells depends on cell differentiation, polarity, and junctional complex integrity. Am J Respir Cell Mol Biol 1999; 20(5):880-890.

PUCHELLE E, JACQUOT J, BECK G, ZAHM JM, GALABERT C.

Rheological and transport properties of airway secretions in cystic fibrosis--relationships with the degree of infection and severity of the disease.

Eur J Clin Invest 1985; 15(6):389-394.

PUCHELLE E, GAILLARD D, PLOTON D, HINNRASKY J, FUCHEY C, BOUTTERIN MC et al.

Differential localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal and cystic fibrosis airway epithelium.

Am J Respir Cell Mol Biol 1992; 7(5):485-491.

PULENDRAN B.

Modulating TH1/TH2 responses with microbes, dendritic cells, and pathogen recognition receptors.

Immunol Res 2004; 29(1-3):187-196.

QUINTON PM.

Chloride impermeability in cystic fibrosis. Nature 1983; 301(5899):421-422.

RANDELL SH, BOUCHER RC.

Effective mucus clearance is essential for respiratory health. Am J Respir Cell Mol Biol 2006; 35(1):20-28.

REINIGER N, ICHIKAWA JK, PIER GB.

Influence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator on gene expression in response to Pseudomonas aeruginosa infection of human bronchial epithelial cells. Infect Immun 2005; 73(10):6822-6830.

REYNOLDS SD, GIANGRECO A, POWER JH, STRIPP BR.

Neuroepithelial bodies of pulmonary airways serve as a reservoir of progenitor cells capable of epithelial regeneration.

Am J Pathol 2000; 156(1):269-278.

RIORDAN JR, ROMMENS JM, KEREM B, ALON N, ROZMAHEL R, GRZELCZAK Z et al.

Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA.

Science 1989; 245(4922):1066-1073.

ROBINSON NP, KYLE H, WEBBER SE, WIDDICOMBE JG.

Electrolyte and other chemical concentrations in tracheal airway surface liquid and mucus. J Appl Physiol 1989; 66(5):2129-2135.

ROGAN MP, GERAGHTY P, GREENE CM, O'NEILL SJ, TAGGART CC, MCELVANEY NG.

Antimicrobial proteins and polypeptides in pulmonary innate defence. Respir Res 2006; 7:29.

ROLLINS BJ.

Chemokines. Blood 1997; 90(3):909-928.

ROMMENS JM, IANNUZZI MC, KEREM B, DRUMM ML, MELMER G, DEAN M et al.

Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. Science 1989; 245(4922):1059-1065.

ROSE F, DAHLEM G, GUTHMANN B, GRIMMINGER F, MAUS U, HANZE J et al.

Mediator generation and signaling events in alveolar epithelial cells attacked by S. aureus alpha-toxin.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2002; 282(2):L207-L214.

ROSENBERG MF, KAMIS AB, ALEKSANDROV LA, FORD RC, RIORDAN JR.

Purification and crystallization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR).

J Biol Chem 2004; 279(37):39051-39057.

ROSSI D, ZLOTNIK A.

The biology of chemokines and their receptors. Annu Rev Immunol 2000; 18:217-242.

ROTHENBERG ME, LUSTER AD, LEDER P.

Murine eotaxin: an eosinophil chemoattractant inducible in endothelial cells and in interleukin 4-induced tumor suppression.

Proc Natl Acad Sci U S A 1995a; 92(19):8960-8964.

ROTHENBERG ME, LUSTER AD, LILLY CM, DRAZEN JM, LEDER P.

Constitutive and allergen-induced expression of eotaxin mRNA in the guinea pig lung. J Exp Med 1995b; 181(3):1211-1216.

ROUSE BT, SARANGI PP, SUVAS S.

Regulatory T cells in virus infections. Immunol Rev 2006; 212:272-286.

ROWE SM, MILLER S, SORSCHER EJ.

Cystic fibrosis. N Engl J Med 2005; 352(19):1992-2001.

RUTLAND J, GRIFFIN WM, COLE PJ.

Human ciliary beat frequency in epithelium from intrathoracic and extrathoracic airways. Am Rev Respir Dis 1982; 125(1):100-105.

SAJJAN US, HERSHENSON MB, FORSTNER JF, LIPUMA JJ.

Burkholderia cenocepacia ET12 strain activates TNFR1 signalling in cystic fibrosis airway epithelial cells.

Cell Microbiol 2007.

SAKAGUCHI S, SAKAGUCHI N, ASANO M, ITOH M, TODA M.

Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alphachains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases.

J Immunol 1995; 155(3):1151-1164.

SAKAGUCHI S.

Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self.

Nat Immunol 2005; 6(4):345-352.

SALLUSTO F, PALERMO B, HOY A, LANZAVECCHIA A.

The role of chemokine receptors in directing traffic of naive, type 1 and type 2 T cells. Curr Top Microbiol Immunol 1999; 246:123-128.

SANFORD MD, WIDMER AF, BALE MJ, JONES RN, WENZEL RP.

Efficient detection and long-term persistence of the carriage of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.

Clin Infect Dis 1994; 19(6):1123-1128.

SAUTY A, DZIEJMAN M, TAHA RA, IAROSSI AS, NEOTE K, GARCIA-ZEPEDA EA et al.

The T cell-specific CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC are expressed by activated human bronchial epithelial cells.

J Immunol 1999; 162(6):3549-3558.

SCHALLER-BALS S, SCHULZE A, BALS R.

Increased levels of antimicrobial peptides in tracheal aspirates of newborn infants during infection.

Am J Respir Crit Care Med 2002; 165(7):992-995.

SCHNARE M, BARTON GM, HOLT AC, TAKEDA K, AKIRA S, MEDZHITOV R.

Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. Nat Immunol 2001; 2(10):947-950.

SCHROTH MK, GRIMM E, FRINDT P, GALAGAN DM, KONNO SI, LOVE R et al.

Rhinovirus replication causes RANTES production in primary bronchial epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol 1999; 20(6):1220-1228.

SCHUTTE BC, MCCRAY PB, JR.

[beta]-defensins in lung host defense. Annu Rev Physiol 2002; 64:709-748.

SCHWAB UE, WOLD AE, CARSON JL, LEIGH MW, CHENG PW, GILLIGAN PH et al.

Increased adherence of Staphylococcus aureus from cystic fibrosis lungs to airway epithelial cells.

Am Rev Respir Dis 1993; 148(2):365-369.

SCHWIEBERT EM, EGAN ME, HWANG TH, FULMER SB, ALLEN SS, CUTTING GR et al.

CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP.

Cell 1995; 81(7):1063-1073.

SEO HS, MICHALEK SM, NAHM MH.

Lipoteichoic acid is important in innate immune responses to Gram-positive bacteria. Infect Immun 2007.

SHAK S, CAPON DJ, HELLMISS R, MARSTERS SA, BAKER CL.

Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. Proc Natl Acad Sci U S A 1990; 87(23):9188-9192.

SHEBANI E, SHAHANA S, JANSON C, ROOMANS GM.

Attachment of columnar airway epithelial cells in asthma. Tissue Cell 2005; 37(2):145-152.

SHEPPARD DN, OSTEDGAARD LS, RICH DP, WELSH MJ.

The amino-terminal portion of CFTR forms a regulated Cl- channel. Cell 1994; 76(6):1091-1098.

SHEVACH EM.

CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. Nat Rev Immunol 2002; 2(6):389-400.

SHUTER J, HATCHER VB, LOWY FD.

Staphylococcus aureus binding to human nasal mucin. Infect Immun 1996; 64(1):310-318.

SINGH G, KATYAL SL.

Clara cells and Clara cell 10 kD protein (CC10). Am J Respir Cell Mol Biol 1997; 17(2):141-143.

SINGH PK, JIA HP, WILES K, HESSELBERTH J, LIU L, CONWAY BA et al.

Production of beta-defensins by human airway epithelia. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95(25):14961-14966.

SINHA B, FRANCOIS P, QUE YA, HUSSAIN M, HEILMANN C, MOREILLON P et al.

Heterologously expressed Staphylococcus aureus fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. Infect Immun 2000; 68(12):6871-6878.

SKOV M, MCKAY K, KOCH C, COOPER PJ.

Prevalence of allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis in an area with a high frequency of atopy. Respir Med 2005; 99(7):887-893.

SNOW EC.

Handbook of B and T lymphocytes. San Diego Academic Press, 1994.

SOONG LB, GANZ T, ELLISON A, CAUGHEY GH.

Purification and characterization of defensins from cystic fibrosis sputum. Inflamm Res 1997; 46(3):98-102.

SPICER SS, MOCHIZUKI I, SETSER ME, MARTINEZ JR.

Complex carbohydrates of rat tracheobronchial surface epithelium visualized ultrastructurally. Am J Anat 1980; 158(1):93-109.

SPINA D.

Epithelium smooth muscle regulation and interactions. Am J Respir Crit Care Med 1998; 158(5 Pt 3):S141-S145.

SPRENT J, SURH CD.

T cell memory. Annu Rev Immunol 2002; 20:551-579.

SPURRELL JC, WIEHLER S, ZAHEER RS, SANDERS SP, PROUD D.

Human airway epithelial cells produce IP-10 (CXCL10) in vitro and in vivo upon rhinovirus infection.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2005; 289(1):L85-L95.

STOCKINGER B. VELDHOEN M.

Differentiation and function of Th17 T cells. Curr Opin Immunol 2007; 19(3):281-286.

STUTTS MJ, CANESSA CM, OLSEN JC, HAMRICK M, COHN JA, ROSSIER BC et al.

CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. Science 1995; 269(5225):847-850.

SWITALSKI LM, PATTI JM, BUTCHER W, GRISTINA AG, SPEZIALE P, HOOK M.

A collagen receptor on Staphylococcus aureus strains isolated from patients with septic arthritis mediates adhesion to cartilage. Mol Microbiol 1993; 7(1):99-107.

TABARY O, ZAHM JM, HINNRASKY J, COUETIL JP, CORNILLET P, **GUENOUNOU M et al.**

Selective up-regulation of chemokine IL-8 expression in cystic fibrosis bronchial gland cells in vivo and in vitro.

Am J Pathol 1998; 153(3):921-930.

TAKAHASHI A, WADA A, OGUSHI K, MAEDA K, KAWAHARA T, MAWATARI K et al.

Production of beta-defensin-2 by human colonic epithelial cells induced by Salmonella enteritidis flagella filament structural protein.

FEBS Lett 2001; 508(3):484-488.

TAKATA H, TOMIYAMA H, FUJIWARA M, KOBAYASHI N, TAKIGUCHI M.

Cutting edge: expression of chemokine receptor CXCR1 on human effector CD8+ T cells. J Immunol 2004; 173(4):2231-2235.

TAKEUCHI O, HOSHINO K, AKIRA S.

Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to Staphylococcus aureus infection.

J Immunol 2000; 165(10):5392-5396.

TANI K, SU SB, UTSUNOMIYA I, OPPENHEIM JJ, WANG JM.

Interferon-gamma maintains the binding and functional capacity of receptors for IL-8 on cultured human T cells.

Eur J Immunol 1998; 28(2):502-507.

TEKKANAT KK, MAASSAB HF, CHO DS, LAI JJ, JOHN A, BERLIN A et al. IL-13-induced airway hyperreactivity during respiratory syncytial virus infection is STAT6

dependent.

J Immunol 2001; 166(5):3542-3548.

TEKSTRA J, BEEKHUIZEN H, VAN DE GEVEL JS, VAN BENTEN IJ, TUK CW, BEELEN RH.

Infection of human endothelial cells with Staphylococcus aureus induces the production of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) and monocyte chemotaxis. Clin Exp Immunol 1999; 117(3):489-495.

THOMSON AW.

The cytokine handbook. 2nd edition London Academic Press, 1994.

TIROUVANZIAM R, DE BENTZMANN S, HUBEAU C, HINNRASKY J, JACQUOT J, PEAULT B et al.

Inflammation and infection in naive human cystic fibrosis airway grafts. Am J Respir Cell Mol Biol 2000; 23(2):121-127.

TONG HH, LONG JP, SHANNON PA, DEMARIA TF.

Expression of cytokine and chemokine genes by human middle ear epithelial cells induced by influenza A virus and Streptococcus pneumoniae opacity variants. Infect Immun 2003; 71(8):4289-4296.

TRAVIS SM, CONWAY BA, ZABNER J, SMITH JJ, ANDERSON NN, SINGH PK et al.

Activity of abundant antimicrobials of the human airway. Am J Respir Cell Mol Biol 1999; 20(5):872-879.

TREZISE AE, CHAMBERS JA, WARDLE CJ, GOULD S, HARRIS A.

Expression of the cystic fibrosis gene in human foetal tissues. Hum Mol Genet 1993; 2(3):213-218.

TRINCHIERI G, SHER A.

Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. Nat Rev Immunol 2007; 7(3):179-190.

TSAI WC, STRIETER RM, MEHRAD B, NEWSTEAD MW, ZENG X, STANDIFORD TJ.

CXC chemokine receptor CXCR2 is essential for protective innate host response in murine Pseudomonas aeruginosa pneumonia.

Infect Immun 2000; 68(7):4289-4296.

TSUI LC, BUCHWALD M, BARKER D, BRAMAN JC, KNOWLTON R, SCHUMM JW et al.

Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. Science 1985; 230(4729):1054-1057.

TSUTSUMI-ISHII Y, NAGAOKA I.

NF-kappa B-mediated transcriptional regulation of human beta-defensin-2 gene following lipopolysaccharide stimulation. J Leukoc Biol 2002; 71(1):154-162.

TUAZON CU, SHEAGREN JN.

Increased rate of carriage of Staphylococcus aureus among narcotic addicts. J Infect Dis 1974; 129(6):725-727.

TUAZON CU, PEREZ A, KISHABA T, SHEAGREN JN.

Staphylococcus aureus among insulin-injecting diabetic patients. An increased carrier rate. JAMA 1975; 231(12):1272.

TUFANO MA, CIPOLLARO DL, IANNIELLO R, GALDIERO M, GALDIERO F.

Protein A and other surface components of Staphylococcus aureus stimulate production of IL-1 alpha, IL-4, IL-6, TNF and IFN-gamma. Eur Cytokine Netw 1991; 2(5):361-366.

UEHARA A, FUJIMOTO Y, KAWASAKI A, KUSUMOTO S, FUKASE K, TAKADA H.

Meso-diaminopimelic acid and meso-lanthionine, amino acids specific to bacterial peptidoglycans, activate human epithelial cells through NOD1. J Immunol 2006; 177(3):1796-1804.

ULRICH M, HERBERT S, BERGER J, BELLON G, LOUIS D, MUNKER G et al. Localization of Staphylococcus aureus in infected airways of patients with cystic fibrosis and in a cell culture model of S. aureus adherence. Am J Respir Cell Mol Biol 1998; 19(1):83-91.

UMETSU DT, DEKRUYFF RH.

The regulation of allergy and asthma. Immunol Rev 2006; 212:238-255.

UNDERHILL DM, OZINSKY A.

Phagocytosis of microbes: complexity in action. Annu Rev Immunol 2002; 20:825-852.

VAN SCOTT MR, HESTER S, BOUCHER RC.

Ion transport by rabbit nonciliated bronchiolar epithelial cells (Clara cells) in culture. Proc Natl Acad Sci U S A 1987; 84(15):5496-5500.

VARSANO S, BASBAUM CB, FORSBERG LS, BORSON DB, CAUGHEY G, NADEL JA.

Dog tracheal epithelial cells in culture synthesize sulfated macromolecular glycoconjugates and release them from the cell surface upon exposure to extracellular proteinases. Exp Lung Res 1987; 13(2):157-184.

VERDUGO P.

Goblet cells secretion and mucogenesis. Annu Rev Physiol 1990; 52:157-176.

VIDAL VF, CASTERAN N, RIENDEAU CJ, KORNFELD H, DARCISSAC EC, CAPRON A et al.

Macrophage stimulation with Murabutide, an HIV-suppressive muramyl peptide derivative, selectively activates extracellular signal-regulated kinases 1 and 2, C/EBPbeta and STAT1: role of CD14 and Toll-like receptors 2 and 4.

Eur J Immunol 2001; 31(7):1962-1971.

VILLARD J, DAYER-PASTORE F, HAMACHER J, AUBERT JD, SCHLEGEL-HAUETER S, NICOD LP.

GRO alpha and interleukin-8 in Pneumocystis carinii or bacterial pneumonia and adult respiratory distress syndrome.

Am J Respir Crit Care Med 1995; 152(5 Pt 1):1549-1554.

VOGELMEIER C, HUBBARD RC, FELLS GA, SCHNEBLI HP, THOMPSON RC, FRITZ H et al.

Anti-neutrophil elastase defense of the normal human respiratory epithelial surface provided by the secretory leukoprotease inhibitor.

J Clin Invest 1991; 87(2):482-488.

VON ANDRIAN UH, MEMPEL TR.

Homing and cellular traffic in lymph nodes. Nat Rev Immunol 2003; 3(11):867-878.

VON AULOCK S, MORATH S, HARENG L, KNAPP S, VAN KESSEL KP, VAN STRIJP JA et al.

Lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus is a potent stimulus for neutrophil recruitment. Immunobiology 2003; 208(4):413-422.

WALDMANN H, ADAMS E, FAIRCHILD P, COBBOLD S.

Infectious tolerance and the long-term acceptance of transplanted tissue. Immunol Rev 2006; 212:301-313.

WALEV I, RESKE K, PALMER M, VALEVA A, BHAKDI S.

Potassium-inhibited processing of IL-1 beta in human monocytes. EMBO J 1995; 14(8):1607-1614.

WANGE RL, SAMELSON LE.

Complex complexes: signaling at the TCR. Immunity 1996; 5(3):197-205.

WEI S, KRYCZEK I, ZOU W.

Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking. Blood 2006; 108(2):426-431.
WEINER HL.

Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells.

Immunol Rev 2001; 182:207-214.

WEINKE T, SCHILLER R, FEHRENBACH FJ, POHLE HD.

Association between Staphylococcus aureus nasopharyngeal colonization and septicemia in patients infected with the human immunodeficiency virus. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992; 11(11):985-989.

WELDON S, TAGGART CC.

Innate host defense functions of secretory leucoprotease inhibitor. Exp Lung Res 2007; 33(10):485-491.

WENINGER W, MANJUNATH N, VON ANDRIAN UH.

Migration and differentiation of CD8+ T cells. Immunol Rev 2002; 186:221-233.

WIDDICOMBE JG, PACK RJ.

The Clara cell. Eur J Respir Dis 1982; 63(3):202-220.

WIDDICOMBE JG.

Airway mucus. Eur Respir J 1989; 2(2):107-115.

WINE JJ.

The genesis of cystic fibrosis lung disease. J Clin Invest 1999; 103(3):309-312.

WING K, LINDGREN S, KOLLBERG G, LUNDGREN A, HARRIS RA, RUDIN A et al.

CD4 T cell activation by myelin oligodendrocyte glycoprotein is suppressed by adult but not cord blood CD25+ T cells.

Eur J Immunol 2003; 33(3):579-587.

WISZNIEWSKI L, JORNOT L, DUDEZ T, PAGANO A, ROCHAT T, LACROIX JS et al.

Long-term cultures of polarized airway epithelial cells from patients with cystic fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol 2006; 34(1):39-48.

WORLITZSCH D, TARRAN R, ULRICH M, SCHWAB U, CEKICI A, MEYER KC et al.

Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients.

J Clin Invest 2002; 109(3):317-325.

WYATT HA, SAMPSON AP, BALFOUR-LYNN IM, PRICE JF.

Production of the potent neutrophil chemokine, growth-related protein alpha (GROalpha), is not elevated in cystic fibrosis children. Respir Med 2000; 94(2):106-111.

WYSOCKI CA, JIANG Q, PANOSKALTSIS-MORTARI A, TAYLOR PA, MCKINNON KP, SU L et al.

Critical role for CCR5 in the function of donor CD4+CD25+ regulatory T cells during acute graft-versus-host disease.

Blood 2005; 106(9):3300-3307.

XU M, WANG Z, LOCKSLEY RM.

Innate immune responses in peptidoglycan recognition protein L-deficient mice. Mol Cell Biol 2004; 24(18):7949-7957.

YAMADA S, NELSON WJ.

Synapses: sites of cell recognition, adhesion, and functional specification. Annu Rev Biochem 2007; 76:267-294.

YE P, GARVEY PB, ZHANG P, NELSON S, BAGBY G, SUMMER WR et al.

Interleukin-17 and lung host defense against Klebsiella pneumoniae infection. Am J Respir Cell Mol Biol 2001a; 25(3):335-340.

YE P, RODRIGUEZ FH, KANALY S, STOCKING KL, SCHURR J, SCHWARZENBERGER P et al.

Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. J Exp Med 2001b; 194(4):519-527.

YOSHIDA R, IMAI T, HIESHIMA K, KUSUDA J, BABA M, KITAURA M et al. Molecular cloning of a novel human CC chemokine EBI1-ligand chemokine that is a specific functional ligand for EBI1, CCR7. J Biol Chem 1997; 272(21):13803-13809.

YOSHIMURA A, LIEN E, INGALLS RR, TUOMANEN E, DZIARSKI R, GOLENBOCK D.

Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. J Immunol 1999; 163(1):1-5.

YOSHIMURA K, NAKAMURA H, TRAPNELL BC, CHU CS, DALEMANS W, PAVIRANI A et al.

Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in cells of non-epithelial origin.

Nucleic Acids Res 1991; 19(19):5417-5423.

YOUNGSON C, NURSE C, YEGER H, CUTZ E.

Oxygen sensing in airway chemoreceptors. Nature 1993; 365(6442):153-155.

YU VL, GOETZ A, WAGENER M, SMITH PB, RIHS JD, HANCHETT J et al. Staphylococcus aureus nasal carriage and infection in patients on hemodialysis. Efficacy of antibiotic prophylaxis.

N Engl J Med 1986; 315(2):91-96.

ZABNER J, SMITH JJ, KARP PH, WIDDICOMBE JH, WELSH MJ.

Loss of CFTR chloride channels alters salt absorption by cystic fibrosis airway epithelia in vitro.

Mol Cell 1998; 2(3):397-403.

ZAHM JM, PIERROT D, HINNRASKY J, FUCHEY C, CHEVILLARD M, GAILLARD D et al.

Functional activity of ciliated outgrowths from cultured human nasal and tracheal epithelia. Biorheology 1990; 27(3-4):559-565.

ZEREMSKI M, PETROVIC LM, TALAL AH.

The role of chemokines as inflammatory mediators in chronic hepatitis C virus infection. J Viral Hepat 2007; 14(10):675-687.

ZIELENSKI J, TSUI LC.

Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. Annu Rev Genet 1995; 29:777-807.

ZOU L, BARNETT B, SAFAH H, LARUSSA VF, EVDEMON-HOGAN M, MOTTRAM P et al.

Bone marrow is a reservoir for CD4+CD25+ regulatory T cells that traffic through CXCL12/CXCR4 signals.

Cancer Res 2004; 64(22):8451-8455.

ZUANY-AMORIM C, SAWICKA E, MANLIUS C, LE MOINE A, BRUNET LR, KEMENY DM et al.

Suppression of airway eosinophilia by killed Mycobacterium vaccae-induced allergen-specific regulatory T-cells.

Nat Med 2002a; 8(6):625-629.

ZUANY-AMORIM C, MANLIUS C, TRIFILIEFF A, BRUNET LR, ROOK G, BOWEN G et al.

Long-term protective and antigen-specific effect of heat-killed Mycobacterium vaccae in a murine model of allergic pulmonary inflammation.

J Immunol 2002b; 169(3):1492-1499.

Denise AL ALAM

IMPACT OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* INTERACTION WITH BRONCHIAL EPITHELIAL CELLS ON T CELL CHEMOTAXIS IN CYSTIC FIBROSIS.

PhD. Thesis: Immunology: Reims: 2008

Abstract:

Staphylococcus aureus is one of the major pathogens infiltrating the lungs of cystic fibrosis (CF) patients. Upon S. aureus infection, airway epithelial cells produce high levels of chemokines that enhance T cell chemotaxis. Although increased numbers of lymphocytes are present in the airways and bronchoalveolar lavage fluid of CF patients, the mechanisms responsible for their accumulation and the role of S. aureus are still largely unknown. Our study aims to investigate the impact of S. aureus on chemokine secretion by CF epithelial cells and subsequent chemotaxis of CF T cells. Non-CF and CF airway epithelial cells were grown in a double chamber model then apically stimulated with S. aureus. Supernatants were quantified for chemokine secretions and assayed for T cell chemotaxis using a Boyden chamber. We showed that CF epithelial cells secreted larger amounts of chemokines than non-CF epithelial cells. S. aureus interaction with epithelial cells increased chemokine production by non-CF cells, whereas it had no effect on CF cells. Interestingly, CF T cell chemotaxis was always greater than non-CF T cell chemotaxis and CF T cells expressed more CXCR1 as compared to non-CF T cells. These observations suggest that IL-8 and its receptor CXCR1 contribute to the recruitment of T cells in CF patients, and could be used as therapeutic targets in CF.

Key words:

Cystic fibrosis, airway mucosa, T cells, chemokines.

Thesis Advisor:

Prof. Sophie GANGLOFF

Thesis Committee:

Prof. Moncef GUENOUNOU, Prof. Bruno CRESTANI, Dr. Lhousseine TOUQUI, Dr. Jean-Claude SIRARD.

<u>Address of the author :</u> Denise AL ALAM – 8 rue Alfred de Musset – 69330 Meyzieu.

Denise AL ALAM IMPACT DE L'INTERACTION ENTRE LES CELLULES EPITHELIALES BRONCHIQUES ET *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SUR LE CHIMIOTACTISME DES LYMPHOCYTES T DANS LA MUCOVISCIDOSE. Thèse Pharm. Univ. : Immunol. : Reims : 2008

<u>Résumé :</u>

S. aureus est retrouvé de façon précoce chez les personnes atteintes de la mucoviscidose (CF). Chez ces personnes, de nombreuses cellules immunes s'accumulent dans les poumons où l'épithélium est sévèrement lésé. Cependant, le rôle de *S. aureus* dans la réponse inflammatoire des cellules épithéliales bronchiques et l'accumulation des lymphocytes T (LT) est encore mal défini.

Le développement d'un modèle de culture en double chambre, a permis de montrer que les cellules épithéliales non-CF produisent des chimiokines et que *S. aureus* augmente la sécrétion d'IL-8 et d'éotaxine par ces cellules. Parallèlement, une migration accentuée des LT vis-à-vis des surnageants des cellules infectées par *S. aureus* est observée.

A l'état basal, les cellules épithéliales CF sécrètent des quantités plus importantes de chimiokines que les cellules non-CF. L'interaction de *S. aureus* avec ces cellules n'entraîne pas de variations significatives de la production d'IL-8. De plus, les LT de patients CF présentent un indice de chimiotactisme plus important que les LT non-CF vis-à-vis des surnageants de culture des cellules, sans accentuation de leur migration vis-à-vis des surnageants de culture de cellules épithéliales CF stimulées par *S. aureus*. Parallèlement, le nombre des LT exprimant CXCR1, est plus important dans les LT CF par rapport aux LT non-CF.

Nos résultats suggèrent que les cellules épithéliales non-CF stimulées par *S. aureus* induisent le chimiotactisme des LT non-CF vers le site infectieux alors que le chimiotactisme des LT CF est accentué avant toute infection. De plus, l'IL-8 et son récepteur CXCR1, jouent un rôle important dans la migration des LT dans la mucoviscidose.

Mots clés :

Mucoviscidose, muqueuse respiratoire, *Staphylococcus aureus*, lymphocytes T, chimiokines.

JURY

Président Rapporteurs Pr. Moncef GUENOUNOU Pr. Bruno CRESTANI Dr. Lhousseine TOUQUI Dr. Jean-Claude SIRARD Pr. Sophie GANGLOFF

Examinateurs

<u>Adresse de l'auteur :</u> Denise AL ALAM – 8 rue Alfred de Musset – 69330 Meyzieu.