

THÈSE  
en vue de l'obtention du grade

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE II

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

**Delphine FOUGERON**

Le 6 Décembre 2013

**Caractérisation moléculaire et cellulaire de l'activité adjuvante  
de la flagelline dans la vaccination muqueuse**

Jury :

Monsieur le Professeur Lionel PRIN  
Madame le Docteur Fabienne ANJUÈRE  
Madame le Docteur Hamida HAMMAD  
Madame le Docteur Catherine CAILLET  
Monsieur le Docteur Lionel POULIN  
Monsieur le Docteur Jean-Claude SIRARD

Président du Jury  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse



THÈSE  
en vue de l'obtention du grade

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE II

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

**Delphine FOUGERON**

Le 6 Décembre 2013

**Caractérisation moléculaire et cellulaire de l'activité adjuvante  
de la flagelline dans la vaccination muqueuse**

Jury :

Monsieur le Professeur Lionel PRIN  
Madame le Docteur Fabienne ANJUÈRE  
Madame le Docteur Hamida HAMMAD  
Madame le Docteur Catherine CAILLET  
Monsieur le Docteur Lionel POULIN  
Monsieur le Docteur Jean-Claude SIRARD

Président du Jury  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse

# TABLE DES MATIÈRES

<b>ABREVIATIONS .....</b>	<b>6</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS.....</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>10</b>
<b>1 STIMULATION DES REPONSES IMMUNITAIRES INNEES ET ADAPTATIVES .....</b>	<b>11</b>
1.1 DETECTION DES PATHOGENES PAR LES RECEPTEURS DE L'IMMUNITE INNEE .....	11
1.1.1 "Toll-Like Receptors" .....	11
1.1.2 "NOD-Like Receptors".....	19
1.1.3 "RIG-I-like receptors".....	22
1.1.4 "C-type Lectin Receptors" .....	23
1.1.5 Ajustement de la réponse immunitaire à la menace microbienne.....	23
1.1.6 Utilisations précliniques et cliniques des agonistes de la réponse innée.....	25
1.2 LE ROLE CENTRAL DES CELLULES PRESENTATRICES D'ANTIGENE DANS L'IMMUNITE ADAPTATIVE.....	26
1.2.1 Ontogénie et classification des phagocytes mononucléés : DC et monocytes .....	26
1.2.2 Rôles des cellules du système des phagocytes mononucléés dans l'immunité .....	30
1.2.3 Principales fonctions des cellules dendritiques .....	31
1.3 LES REPONSES IMMUNITAIRES ADAPTATIVES.....	34
1.3.1 Lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> et réponse cytotoxique.....	34
1.3.2 Lymphocytes T CD4 et réponse T helper.....	35
1.3.3 Réponse en anticorps.....	37
<b>2 LE SYSTEME IMMUNITAIRE MUQUEUX.....</b>	<b>38</b>
2.1 MUQUEUSES ET IMMUNITE INNEE.....	38
2.1.1 Fonctions de barrières.....	38
2.1.2 La défense innée inductible des muqueuses : le recrutement de cellules immunitaires ..	41
2.2 ORGANISATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE ADAPTATIF DES MUQUEUSES.....	42
2.2.1 Induction de l'immunité muqueuse.....	43
2.2.2 Les populations d'APC respiratoires .....	45
2.3 REPONSES IMMUNITAIRES MUQUEUSES A L'HOMEOSTASIE.....	46
2.3.1 Influence des cytokines épithéliales sur l'homéostasie des DC muqueuses .....	47
2.3.2 Les IgA : une garantie de la paix des muqueuses.....	49
2.3.3 Adressage muqueux des lymphocytes.....	49
2.4 REPONSES ADAPTATIVES MUQUEUSES EN CONDITIONS PATHOLOGIQUES.....	50
2.4.1 Recrutement des phagocytes.....	51
2.4.2 Activation épithéliale en condition pathologique et maturation fonctionnelle des APC...	51
2.4.3 Réponses Th17 et Th1 .....	54
2.4.4 Réponse IgG et IgA contre les pathogènes.....	55
<b>3 VACCINS ET ADJUVANTS.....</b>	<b>57</b>
3.1 SUCCES DE LA VACCINATION ET DEFIS FUTURS.....	57

3.2	VACCINS SYSTEMIQUES ET MUQUEUX .....	58
3.3	POURQUOI UTILISER DES ADJUVANTS ? .....	59
3.4	ADJUVANTS VACCINAUX .....	61
3.4.1	Systèmes de délivrances .....	62
3.4.2	Adjuvants Immunostimulants.....	63
3.4.3	Adjuvants à activité mixte.....	64
3.4.4	Adjuvants muqueux.....	68
	<b><u>ETUDE EXPERIMENTALE .....</u></b>	<b><u>73</u></b>
<b>1</b>	<b>OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE .....</b>	<b>74</b>
<b>2</b>	<b>ARTICLE 1 : L'EFFET ADJUVANT MUQUEUX DE LA FLAGELLINE EST REGULE PAR LA SIGNALISATION TLR5 DANS LES CELLULES EPITHELIALES BRONCHIQUES .....</b>	<b>77</b>
2.1	INTRODUCTION .....	77
2.2	ARTICLE 1 .....	79
2.3	RESULTATS COMPLEMENTAIRES A L'ARTICLE 1 .....	104
<b>3</b>	<b>ARTICLE 2 : L'ACTIVATION TLR5-INDEPENDANTE DES DC CONVENTIONNELLES PULMONAIRES EST RESPONSABLE DE L'EFFET ADJUVANT MUQUEUX DE LA FLAGELLINE .....</b>	<b>108</b>
3.1	INTRODUCTION .....	108
3.2	ARTICLE 2.....	110
3.3	RESULTATS COMPLEMENTAIRES A L'ARTICLE 2 .....	125
	<b><u>DISCUSSION.....</u></b>	<b><u>131</u></b>
	<b><u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</u></b>	<b><u>144</u></b>

# ABREVIATIONS

---

<b>ADN</b>	Acide DésoxyRiboNucléique
<b>ARN</b>	Acide RiboNucléique
<b>APC</b>	<i>Antigen-Presenting Cell</i> (Cellule Présentatrice d'Antigène)
<b>ATP</b>	Adénosine Tri Phosphate
<b>CD</b>	<i>Cluster of Differentiation</i>
<b>CLR</b>	<i>C-type Lectin Receptor</i>
<b>CT</b>	<i>Toxine Cholérique</i>
<b>DAMP</b>	<i>Damage-Associated Molecular Pattern</i>
<b>DC</b>	<i>Dendritic Cell</i>
<b>cDC</b>	<i>conventional Dendritic Cell</i> (cellule dendritique conventionnelle)
<b>moDC</b>	<i>monocyte-derived Dendritic Cell</i> (cellule dendritique dérivée de monocyte)
<b>pDC</b>	<i>plasmacytoid Dendritic Cell</i> (cellule dendritique plasmacytoïde)
<b>IFN</b>	<i>Interferon</i>
<b>IL</b>	<i>Interleukine</i>
<b>Ig</b>	Immunoglobuline
<b>LPS</b>	<i>Lipopolysaccharide</i>
<b>LRR</b>	<i>Leucine-Rich Repeat</i>
<b>MHC</b>	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexe Majeur d'Histocompatibilité)
<b>MAMP</b>	<i>Microbe-Associated Molecular Pattern</i>
<b>MyD88</b>	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
<b>NLR</b>	<i>Nod-Like Receptor</i>
<b>PAMP</b>	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>
<b>PMN</b>	<i>Polymorphonuclear Neutrophil</i> (Polynucléaires neutrophiles)
<b>PRR</b>	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
<b>RIG-I</b>	<i>Retinoic acid-inducible gene I</i>
<b>RLR</b>	<i>RIG-I-like receptor</i>
<b>IPAF</b>	<i>ICE (IL-1<math>\beta</math>-converting enzyme) protease activating factor</i>
<b>IRAK</b>	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase</i>
<b>IRF</b>	<i>Interferon regulatory factor</i>
<b>LT</b>	Toxine entérolabile
<b>i.n.</b>	<i>Instranasale</i>
<b>i.m.</b>	<i>Intramusculaire</i>

<b>i.p.</b>	<i>Intrapéritonéale</i>
<b>Mal</b>	<i>MyD88 adaptor-like protein</i>
<b>MALT</b>	<i>Mucosa-associated lymphoid tissue</i>
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
<b>MPL</b>	<i>monophosphoryl lipid A</i>
<b>NAIP</b>	<i>NLR family, apoptosis inhibitory protein</i>
<b>NALT</b>	<i>Nasal-associated lymphoid tissue</i>
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	<i>Nuclear factor-<math>\kappa</math>B</i>
<b>NOD</b>	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
<b>Th</b>	<i>T helper lymphocyte</i>
<b>T<sub>FH</sub></b>	<i>T follicular helper lymphocyte</i>
<b>Treg</b>	<i>lymphocytes T régulateur</i>
<b>TIR</b>	<i>Toll/IL-1R</i>
<b>TIRAP</b>	<i>TIR domain-containing adaptor protein</i>
<b>TLR</b>	<i>Toll-Like Receptor</i>
<b>TNF</b>	<i>Tumor necrosis factor</i>
<b>TRAF</b>	<i>TNF-receptor-associated factor</i>
<b>TRAM</b>	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
<b>TRIF</b>	<i>TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon-<math>\beta</math></i>
<b>VLP</b>	<i>Virus-Like Particles</i>

# Table des illustrations

---

<i>Figure 1 : Structure et organisation du flagelle et de la flagelline</i>	13
<i>Figure 2 : Organisation structurale des récepteurs TLR et analogie avec le récepteur à l'IL-1</i>	15
<i>Figure 3 : Cascades de signalisation des récepteurs TLR</i>	17
<i>Figure 4 : Symétrie et stoechiométrie de la liaison MAMP/TLR</i>	19
<i>Figure 5 : Classification des NLR en fonction des modules exprimés</i>	20
<i>Figure 6 : Structure et assemblage des inflammasomes</i>	21
<i>Figure 7 : Réponse immunitaire innée en fonction du pathogène et de sa menace potentielle</i>	24
<i>Figure 8 : Origine et homéostasie des cellules dendritiques et monocytes</i>	27
<i>Figure 9 : Phagocytes mononucléés à l'état inflammatoire</i>	29
<i>Figure 10 : Apprêtement et présentation des antigènes par les molécules de MHC</i>	33
<i>Figure 11 : Modèle des 3 signaux pour la différenciation des lymphocytes CD4 auxiliaires</i>	34
<i>Figure 12 : Différenciation et rôle des lymphocytes CD4 dans l'immunité</i>	36
<i>Figure 13 : Structure des épithéliums du tractus respiratoire</i>	39
<i>Figure 14 : Mécanismes de défense innée constitutive et inductible dans l'épithélium pulmonaire</i>	40
<i>Figure 15 : Organisation fonctionnelle des muqueuses, MALT et sites effecteurs de l'immunité adaptative de la muqueuse intestinale</i>	42
<i>Figure 16 : Différences entre les muqueuses de type I et de type II dans l'immunité adaptative</i>	44
<i>Figure 17 : Localisation et marqueurs exprimés par les APC pulmonaires</i>	46
<i>Figure 18 : Impact de l'environnement muqueux sur le conditionnement des réponses adaptatives</i>	48
<i>Figure 19 : Recrutement de moDC et induction de réponses Th1 muqueuses</i>	51
<i>Figure 20 : Cytokines épithéliales et maturation des DC dans l'asthme allergique</i>	53
<i>Figure 21 : Modulation du conditionnement muqueux des DC et de la réponse adaptative par des signaux inflammatoires</i>	54
<i>Figure 22 : Le système immunitaire muqueux commun: des réponses effectrices au delà de la muqueuse vaccinée</i>	58
<i>Figure 23 : Classification simplifiée des adjuvants en fonction de leur mode d'action</i>	61
<i>Figure 24 : Organisation structurale des liposomes, virosomes et VLP</i>	63
<i>Figure 25 : Mécanismes d'action de l'alum</i>	65
<i>Figure 26 : Composition et mode d'action de l'adjuvant MF59</i>	67
<i>Figure 27 : Structure de la toxine cholérique et de dérivés atténués</i>	71
<i>Figure 28 : Représentation schématique du modèle d'étude de la vaccination pulmonaire</i>	75
<i>Figure 30: Modèle de contribution des cDC à l'effet adjuvant de la flagelline dans la muqueuse pulmonaire</i>	109
<i>Figure 31 : Mode d'action général des adjuvants vaccinaux</i>	133



<i>Tableau 1 : Caractéristiques des récepteurs TLR et de leurs ligands</i>	<i>12</i>
<i>Tableau 2 : Ligands endogènes des TLR</i>	<i>14</i>
<i>Tableau 3 : Agonistes des PRR en développement clinique pour moduler l'immunité innée</i>	<i>25</i>
<i>Tableau 4 : Filiation des populations de cellules dendritiques murines et humaines</i>	<i>28</i>
<i>Tableau 5 : Caractéristiques des populations d'APC dans les muqueuses</i>	<i>45</i>
<i>Tableau 6 : Principaux vaccins en France en 2013 dans la population générale ou certaines populations à risque</i>	<i>59</i>
<i>Tableau 7: Propriétés des adjuvants vaccinaux ciblant les PRR</i>	<i>64</i>
<i>Tableau 8: Composition et application des systèmes adjuvants développés par GSK</i>	<i>68</i>
<i>Tableau 9 : Principaux adjuvants muqueux en développement</i>	<i>69</i>

# INTRODUCTION

---

## 1 Stimulation des réponses immunitaires innées et adaptatives

Le système immunitaire s'est développé au cours de l'évolution afin de lutter contre les microorganismes pathogènes. Chez les mammifères, il est divisé en deux composantes : le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif. L'immunité innée constitue la 1<sup>ère</sup> ligne de défense contre les pathogènes : elle se caractérise par des réponses rapides et stéréotypées et dont l'efficacité est indépendante d'une exposition préalable au pathogène rencontré. Au contraire la réponse adaptative nécessite un délai de plusieurs jours pour sa mise en place et conduit à une réponse extrêmement spécifique du pathogène rencontré. Ainsi la complémentarité et le couplage de ces deux immunités permettent de lutter efficacement durant toute la dynamique des infections.

### 1.1 DETECTION DES PATHOGENES PAR LES RECEPTEURS DE L'IMMUNITE INNEE

La détection de pathogènes par le système immunitaire innée nécessite des récepteurs appelés PRR (Pattern Recognition Receptor). Les PRR sont génétiquement peu polymorphiques ; pour assurer la détection de tout type de microorganismes, ils reconnaissent de manière spécifique des motifs conservés exprimés par de nombreux germes bactériens, viraux, parasitaires ou fongiques, qu'ils soient pathogènes ou commensaux. Ces motifs génériques ont été dénommés MAMP pour Microbe-Associated Molecular Pattern. Le terme de PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern) est souvent utilisé et s'applique exclusivement aux microorganismes pathogènes. Classiquement, ces récepteurs sont exprimés de façon ubiquitaire sur les cellules hématopoïétiques (monocytes/macrophages, polynucléaires neutrophiles, cellules dendritiques (DC), lymphocytes T et B) mais aussi sur les cellules structurales (les cellules épithéliales ou endothéliales). L'interaction MAMP/PRR déclenche des cascades de signalisation qui provoquent la stimulation quasi-instantanée de l'immunité innée mais aussi des processus conduisant à l'émergence de l'immunité adaptative. Globalement, la reconnaissance MAMP/PRR aboutit à la production d'effecteurs ayant des effets pléiotropes sur le système immunitaire tels que les cytokines pro-inflammatoires, les chimiokines ou encore les interférons (IFN) de type I (Kumar, 2009). Cette propriété d'activation de mécanismes immunitaires aux effets multiples est à l'origine de la définition d'immunité "non spécifique" donnée à l'immunité innée. En fonction de la structure des récepteurs et de la spécificité des MAMP reconnus, différentes classes de PRR ont été identifiées, parmi lesquelles les TLR (Toll-Like Receptors), les NLR (Nod-Like Receptors), les RLR (RIG-I-Like Receptors) et les CLR (C-type Lectin Receptors).

#### 1.1.1 "Toll-Like Receptors"

En 1996, l'équipe de Jules Hoffmann découvre que le récepteur Toll, initialement décrit comme impliqué dans le développement dorso-ventral de la drosophile, possède

également des propriétés anti-fongiques (Lemaitre, 1996). Par la suite, des homologues appelés TLR (Toll-Like Receptors), et ayant un rôle dans l'immunité innée ont été décrits chez l'Homme (Medzhitov, 1997). Ces avancées majeures sur l'activation de l'immunité innée ont été récompensées en 2011 par l'attribution du prix Nobel de médecine et de physiologie à Jules Hoffmann et Bruce Beutler. Chez l'Homme, et les mammifères, 13 TLR ont été décrits (Du, 2000; Roach, 2005), ils se distinguent par leurs ligands, leur voie de signalisation et leur localisation cellulaire.

- Ligands et récepteurs

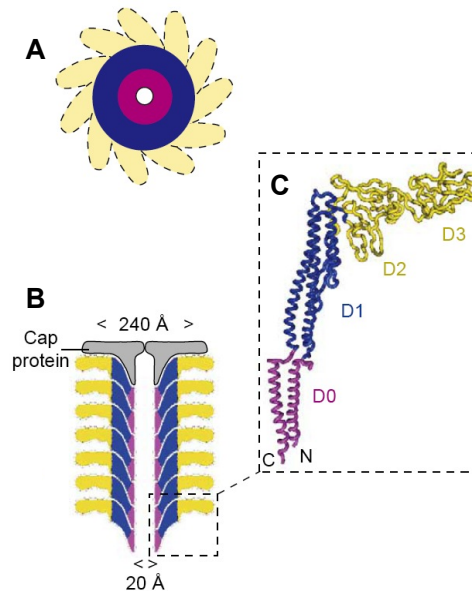
Les TLR reconnaissent des MAMP exprimés par toutes les familles de microorganismes: bactéries, virus, champignons ou parasites (**Tableau 1**).

**Tableau 1 : Caractéristiques des récepteurs TLR et de leurs ligands**

TLR	Localization	Species	Natural ligands	Synthetic ligands	Recognized pathogens	Tissue-specific and cell type-specific expression
TLR1	Extracellular	Humans and mice	Triacyl lipopeptides	Pam3CSK4	Bacteria	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ubiquitous tissue expression</li> <li>• Monocytes, macrophages, DCs, leukocytes, B cells, T cells and NK cells</li> </ul>
TLR2	Extracellular	Humans and mice	Lipoproteins, peptidoglycan, LTA, zymosan and mannan	Pam3CSK4	Bacteria	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Brain, heart, lungs and spleen</li> <li>• Macrophages, DCs and granulocytes</li> </ul>
TLR3	Endolysosomal compartment	Humans and mice	dsRNA	polyI:C and polyU	dsRNA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Placenta and pancreas</li> <li>• DCs, T cells and NK cells</li> </ul>
TLR4	Extracellular and endolysosomal compartment	Humans and mice	LPS, RSV and MMTV fusion protein, mannans, and glyco-inositolphosphate from <i>Trypanosoma</i> spp.	Lipid A derivatives	Gram-negative bacteria and viruses	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Spleen</li> <li>• PBLs, B cells, DCs, monocytes, macrophages, granulocytes and T cells</li> </ul>
TLR5	Extracellular	Humans and mice	Flagellin	ND	Bacteria	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ovaries and prostate</li> <li>• PBLs and monocytes</li> </ul>
TLR6	Extracellular	Humans and mice	Diacylipopeptides, LTA and zymosan	MALP2	Bacteria	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Thymus, spleen and lungs</li> <li>• B cells and monocytes</li> </ul>
TLR7	Endolysosomal compartment	Humans and mice	GU-rich ssRNA and short dsRNA	Imidazoquinolines and guanosine analogues	Viruses and bacteria	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lung, placenta, spleen, lymph nodes and tonsils</li> <li>• Monocytes, B cells and DCs</li> </ul>
TLR8	Endolysosomal compartment	Humans and mice	GU-rich ssRNA, short dsRNA and bacterial RNA*	Imidazoquinolines and guanosine analogues	Viruses and bacteria	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lungs, placenta, spleen, lymph nodes and bone marrow</li> <li>• PBLs and endothelial cells</li> </ul>
TLR9	Endolysosomal compartment	Humans and mice	CpG DNA and hemozoin from <i>Plasmodium</i> spp.	CpG ODNs	Bacteria, viruses and protozoan parasites	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Spleen, lymph nodes and bone marrow</li> <li>• PBLs, B cells and DCs</li> </ul>
TLR10	ND	Humans	ND	ND	ND	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Spleen, lymph nodes, thymus and tonsils</li> <li>• B cells</li> </ul>
TLR11	Endolysosomal compartment	Mice	Profilin and flagellin	ND	Apicomplexan parasites and bacteria (including <i>Salmonella</i> spp. and UPEC)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Spleen, kidney, liver and small intestines</li> <li>• Epithelium, DCs and macrophages</li> </ul>
TLR12	Endolysosomal compartment	Mice	Profilin	ND	Apicomplexan parasites	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Small intestines and spleen</li> <li>• DCs and macrophages</li> </ul>
TLR13	Endolysosomal compartment	Mice	Bacterial 23S rRNA with CCGAAAGACC motif	ND	Gram-negative and Gram-positive bacteria	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Spleen</li> <li>• DCs and macrophages</li> </ul>

Chaque TLR reconnaît un type de MAMP (ou ligands) exprimé par des microorganismes. Ces ligands peuvent être produits synthétiquement et utilisé en clinique. L'expression des TLR peut varier selon l'espèce et l'organe considéré. DC: dendritic cell; dsRNA: ARN double brin; LPS: lipopolysaccharide; LTA: acide lipotechoïque; MALP2: macrophage activating-lipopeptide 2; MMTV: mouse mammary tumour virus; ND: non défini; NK: natural killer; ODN: oligodeoxynucleotide; Pam3CSK4: Pam3Cys-Ser-Lys4-trihydrochloride; PBLs: peripheral blood leukocytes; polyI:C: polyinosinic-polycytidylic acid; polyU: poly-uridine; rRNA: ribosomal RNA; RSV: respiratory syncytial virus; ssRNA: ARN simple brin; TLR: Toll-like receptor; UPEC: uropathogenic *Escherichia coli*. D'après (Broz, 2013).

Au laboratoire, l'activité de recherche est focalisée sur la flagelline FliC de *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, une protéine structurale majeure du flagelle qui est un important facteur de virulence (**Figure 1**).



**Figure 1 : Structure et organisation du flagelle et de la flagelline**

(A, B) Vue schématique du flagelle en coupe transversale (A) et longitudinale (B). (C) Représentation de la structure tridimensionnelle de la flagelline de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Les différents domaines de la flagelline sont : (1) les hélices- $\alpha$  terminales (D0, violet), (2) les hélices- $\alpha$  centrales (D1, bleu), et (3) le domaine hypervariable avec les feuillets- $\beta$  (D2 et D3, jaune). D'après (Ramos, 2004).

Les flagellines exportées par le système de sécrétion de type III se polymérisent spontanément à l'extrémité du flagelle avec le monomère adjacent permettant la croissance hélicoïdale du filament. La protéine FliC de *S. Typhimurium* est composée de 495 acides aminés. La structure tridimensionnelle de la flagelline à l'état libre ainsi que sa structure au sein du flagelle ont été obtenues par diffraction aux rayons X et cryo-microscopie électronique (Samatey, 2001; Yonekura, 2003). Ces études ont mis en évidence quatre domaines distincts D0, D1, D2 et D3 au sein de la flagelline. Les domaines D0 et D1 structurés principalement en hélices- $\alpha$  sont formés des 160 acides aminés de l'extrémité amino-terminale, et des 90 résidus de l'extrémité carboxy-terminale. Les séquences primaires des domaines D0 et D1 sont très conservées entre les flagellines. Chaque surface convexe des domaines D0 et D1 d'une molécule de flagelline interagit avec la zone concave de ces mêmes domaines dans la flagelline adjacente, permettant ainsi l'élaboration du polymère stable. Les domaines D2 et D3 qui forment la région centrale de la protéine ont des séquences primaires extrêmement variables d'une bactérie à une autre. La région de la flagelline responsable des propriétés inflammatoires a été analysée à l'aide de mutants ponctuels, de mutants d'insertion et de comparaisons de séquences de flagellines compétentes ou non pour l'activation de

TLR5. La délétion des domaines D0 et D1 abolit toute capacité de la flagelline à activer TLR5. Les mutations ponctuelles de certains acides aminés (L88A, Q89A, R90A, L94A, Q97A, E114A, I411A, L415A, T420A et L425A) qui réduisent significativement les propriétés immunostimulatrices induisent également une perte de la fonction de mobilité du flagelle. De plus, la flagelline active TLR5 uniquement sous une forme monomérique (Smith, 2003). De façon remarquable, les  $\alpha$ - et  $\epsilon$ -protéobactéries (incluant *Campylobacter*, *Helicobacter*, et *Bartonella*) produisent une flagelline ne pouvant pas activer TLR5 (Andersen-Nissen, 2005). Ces flagellines diffèrent particulièrement de celles des  $\gamma$ -proteobactéries dans la région correspondant aux acides aminés 88 à 97 de la flagelline de *S. Typhimurium*. La délétion ou la substitution de ce motif, et plus particulièrement des résidus 89 à 96, rend la flagelline inactive à signaler via TLR5.

Les TLR participent également à la détection de signaux de dangers endogènes (Damage-Associated Molecular Pattern ou DAMP), dont la libération dans les tissus signale les situations de stress et/ou de mort cellulaire (comme la nécrose ou la pyroptose) (**Tableau 2**). Dans le contexte infectieux, PAMP et DAMP peuvent coopérer pour la stimulation de l'immunité. Les DAMP peuvent être des composants de la matrice extracellulaire, des protéines de choc thermique (HSP), des défensines, notamment produits en réponse à des infections (Kawai, 2010). Les DAMP peuvent également être produits en situation aseptique, c'est le cas des peptides  $\beta$ -amyloïdes générés dans la maladie d'Alzheimer.

**Tableau 2 : Ligands endogènes des TLR**

Récepteur	DAMP
TLR2	$\beta$ -défensine-2, HSP, HMGB1, SAA, SP-A, SP-D
TLR3	ARN du soi (double brin)
TLR4	acide hyaluronique, fibronectine, héparanes sulfate, HSP, HMGB1, LDL oxydés, SAA
TLR7/8	ARN du soi (simple brin)
TLR9	ADN du soi

Modifié d'après (Kawai, 2010). HSP : heat shock protein (protéine de choc thermique) ; LDL : low density lipoprotein (lipoprotéine de basse densité) ; LPS : lipopolysaccharide ; SAA : sérum amyloïde A ; SP : surfactant protein (protéine de surfactant).

- Localisation cellulaire et spécificité d'expression

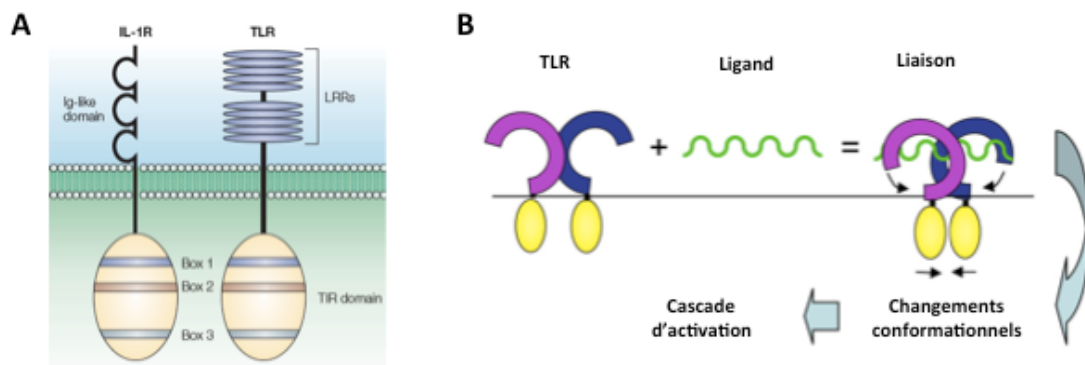
Les TLR sont des récepteurs transmembranaires, exprimés à la surface cellulaire (TLR-1, -2, -4, -5, -6) ou dans des compartiments vésiculaires tels que les endosomes ou les lysosomes (TLR-3, -4, -7, -8 et -9) (**Tableau 1**) (Akira, 2004). Seul TLR4 a été rapporté comme étant présent à la fois dans des compartiments extra- et intracellulaire. D'un point de vue évolutif, il est intéressant de noter que la libération des acides nucléiques nécessitant une

dégradation des microorganismes au sein de phagolysosomes, les TLR spécifiques de ces motifs se soient nichés dans les membranes de ces structures cellulaires.

Les récepteurs de la famille TLR sont exprimés dans toutes les cellules des tissus des mammifères qu'elles soient hématopoïétiques ou structurales. Néanmoins, il existe des différences d'expression selon le type cellulaire et le récepteur TLR considéré (**Tableau 1**). Chez l'Homme, les récepteurs TLR7 et TLR9 sont exclusivement exprimés par les cellules dendritiques (DC) d'origine plasmacytoïde (pDC). De plus, des différences au sein d'un même type cellulaire peuvent apparaître. Par exemple, la majorité des DC des tissus périphériques et des organes lymphoïdes expriment TLR4 mais certaines DC de la *lamina propria*, ne l'expriment pas (Uematsu, 2008; Uematsu, 2006). Au niveau des muqueuses, l'expression des TLR sur les cellules structurales est cruciale car ces cellules sont les premières et les plus nombreuses à rencontrer l'antigène et initient la réponse pro-inflammatoire (Fritz, 2008; Janot, 2009). Ainsi, dans la peau, certains TLR, tels que TLR1-6 et TLR9, sont présents sur les kératinocytes et les cellules endothéliales (Miller, 2007). De même, les cellules épithéliales et les cellules musculaires lisses des voies aériennes, ou encore les cellules épithéliales intestinales expriment de nombreux TLR (Abreu, 2010; Mansson Kvarnhammar, 2013).

- Structure et voies de signalisation

Les TLR sont des glycoprotéines transmembranaires présentant une organisation en 3 domaines (**Figure 2**).



**Figure 2 : Organisation structurale des récepteurs TLR et analogie avec le récepteur à l'IL-1**

(A) Les TLR et le récepteur à l'IL-1 $\beta$  (IL-1R) ont un domaine cytoplasmique conservé appelé TIR caractérisé par la présence de trois régions homologues "box" 1, 2 et 3. Les motifs ou "box" 1 et 2 sont impliqués dans l'interaction homotypique avec les domaines TIR des adaptateurs (tels que MyD88 et TRIF). Les domaines extracellulaires des TLRs et IL-1R sont différents : les chaînes de l'IL-1R sont constituées de trois domaines immunoglobuline (Ig) alors que les TLR se composent de répétitions en tandem de régions riches en leucines (LRR). (B) La reconnaissance d'un MAMP (ou ligand) par un TLR provoque les changements conformationnels des domaines LRR et TIR. Ces changements au niveau des domaines TIR initient la cascade de signalisation. D'après (Akira, 2004).

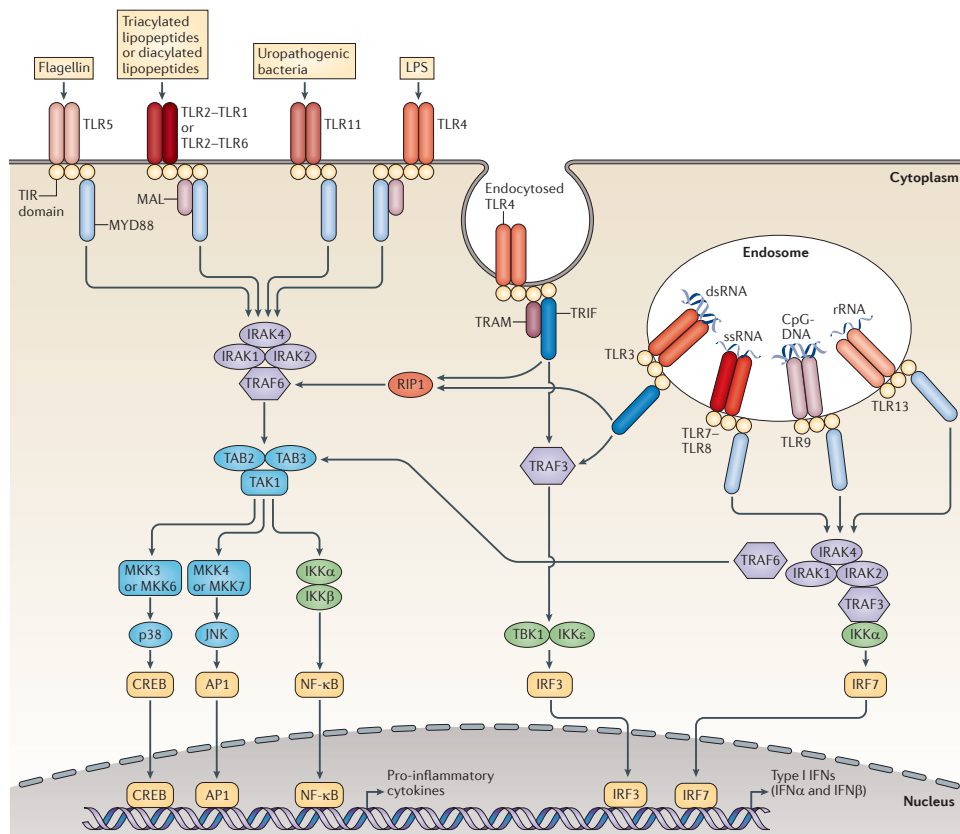
La partie extracellulaire (N-terminale), en forme de fer à cheval, comporte une répétition de motifs riches en leucines (Leucine Rich Repeats ou LRR) (Kumar, 2009). Le motif LRR compte entre 24 et 29 acides aminés qui, répétés de 19 à 25 fois selon les TLR, forment le domaine extracellulaire. Ce domaine N-terminal est relié au domaine C-terminal cytoplasmique par un segment transmembranaire de structure hélicoïdale. Le domaine cytoplasmique est commun à celui des récepteurs de l'interleukine (IL)-1 et est dénommé Toll/IL-1R (TIR). Les domaines TIR des TLR présentent également une homologie significative avec ceux des récepteurs aux cytokines IL-18, IL-33 et IL-36. Les récepteurs de la famille TLR forment des homo- ou hétéro-dimères. Suite à la reconnaissance MAMP/TLR, les 2 domaines TIR de l'homo- ou hétérodimère TLR subissent un changement de conformation provoquant leur activation fonctionnelle indispensable à l'initiation de la cascade de signalisation (Akira, 2004) (**Figure 2**).

Le complexe MAMP/TLR catalyse ainsi le recrutement de molécules adaptatrices telles que MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88), TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ ), TRAM (TRIF-related adaptor molecule) ou Mal/TIRAP (TIR-domain containing adapter protein) (**Figure 3**). L'adaptateur MyD88 est mobilisé par tous les TLR, à l'exception de TLR3 qui signale exclusivement via TRIF (Kumar, 2009). MyD88 possède un domaine TIR en C-terminal et un domaine de mort (Death Domain) en N-terminal. Ainsi il interagit avec le domaine TIR du TLR et avec le domaine de mort des molécules IRAK (IL-1R-associated kinase). Pour TLR-5 et -11, l'interaction TIR/MyD88/IRAK est directe, tandis que pour TLR-1, -2, -6 et -4, Mal/TIRAP sert d'intermédiaire entre le domaine TIR du TLR et MyD88. De plus TLR4 peut utiliser les adaptateurs TRAM et TRIF de façon MyD88 indépendante. La voie de signalisation dépendante de MyD88 permet la phosphorylation de IRAK puis l'activation en cascade de TRAF6, TAK1 et des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1 (via la voie des MAP kinases, ERK, JNK et p38). Cette voie aboutit à la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 ou le TNF (Tumor Necrosis Factor)- $\alpha$ . En sus, TLR-7 et -9 induisent la phosphorylation d'IRF7 et la production d'IFN de type I (en particulier IFN- $\alpha$ ), cruciale lors d'infections virales. Enfin, la voie de signalisation de TRIF, utilisée par TLR3 et TLR4, est caractérisée par l'activation du facteur de transcription IRF3 et la production d'IFN de type I (IFN- $\beta$  en particulier) (Kawai, 2007).

La réponse médiée par les TLR est caractérisée par une cascade de phosphorylation et ubiquitination aboutissant à une activation transcriptionnelle. La signalisation ne nécessite pas de synthèse protéique *de novo* et repose sur la translocation nucléaire quasi-immédiate de régulateurs transcriptionnels. Ainsi, la signalisation TLR se distingue par une transcription très rapide et de grande amplitude de nombreux gènes de l'immunité. Une régulation très fine est nécessaire car une réponse inflammatoire inappropriée ou incontrôlée peut être à l'origine de maladies inflammatoires chroniques ou de maladies auto-immunes (Wang, 2009). La



régulation négative de la signalisation TLR s'effectue à différents niveaux et la plupart effecteurs de cette régulation négative sont induits par la signalisation "positive". La régulation peut opérer de façon précoce, au niveau extracellulaire sur le récepteur lui-même, sur des composants de sa voie de signalisation, ou de façon plus tardive, au niveau nucléaire, sur un facteur de transcription.



**Figure 3 : Cascades de signalisation des récepteurs TLR**

L'interaction homotypique entre les domaines TIR des TLR et des adaptateurs moléculaires (MyD88, Mal/TIRAP, TRIF et TRAM) enclenche la cascade de signalisation. Voie dépendante de MyD88 : Après activation il y a recrutement de MyD88, IRAK1, IRAK2, IRAK4 et TRAF6 pour activer la voie TAK1. Le complexe TAB2-TAB3-TAK1 va alors activer le complexe IKK composé de IKK $\alpha$ , de IKK $\beta$  et IKK $\gamma$ /NEMO qui va catalyser la phosphorylation d'I- $\kappa$ B $\alpha$  molécule qui séquestre l'activateur transcriptionnel NF- $\kappa$ B dans le cytoplasme. La forme phosphorylée d'I- $\kappa$ B $\alpha$  entre dans la voie de dégradation au sein du protéasome, permettant ainsi la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B. TAK1 active également la voie des MAP-kinase-kinase (MKK) qui régule le facteur de transcription AP-1. NF- $\kappa$ B et AP-1 contrôlent l'expression de gènes de l'immunité, en particulier ceux codant des cytokines pro-inflammatoires. Voie dépendante de Mal/TIRAP : Mal/TIRAP est recruté par TLR4 et TLR1/2 et TLR2/6 activant la voie MyD88 dépendante. Voie dépendante de TRIF : TRIF est recruté par TLR3 et TLR4 et interagit avec TBK1 et IKK $\epsilon$  qui régulent la phosphorylation d'IRF3. IRF3 sous sa forme phosphorylée se dimérise et est transporté dans le noyau pour induire l'expression des gènes codant les interférons de type 1. TLR4 utilise TRAM pour l'activation de la voie TRIF-dépendante D'après (O'Neill, 2013)

Les principaux mécanismes de régulation sont la dégradation de molécules impliquées dans la voie de signalisation, leur inactivation ou inhibition par le biais de modifications post-

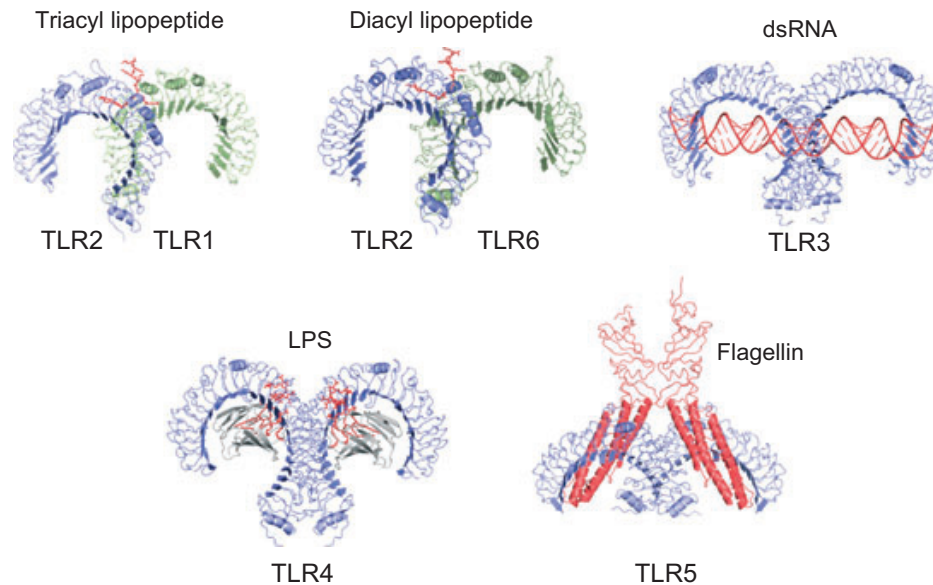
traductionnelles (telle la déubiquitination), ou la compétition par des antagonistes (Wang, 2009). Par exemple, le récepteur RP-105 est spécifiquement impliqué dans la régulation TLR4. Il s'agit d'un récepteur homologue à TLR4, à l'exception du domaine intracellulaire de signalisation. RP105 interagit directement avec le complexe TLR4/MD-2, empêche la liaison du LPS et donc la production de cytokines pro-inflammatoires (Divanovic, 2005). De même, la forme courte de MyD88 (MyD88s) ou IRAK-M qui est produite en réponse à la signalisation TLR4, antagonise l'activation d'IRAK1 par compétition avec MyD88, et empêche ainsi la phosphorylation de IRAK1. La protéine A20 empêche l'activation de TRAF6, un facteur de la cascade de signalisation TLR, en provoquant sa déubiquitination (Kawai, 2010). Enfin la tristetraproline (TTP ou Zfp36) est une protéine de la famille des « *zinc finger proteins* » agissant de façon plus spécifique et tardive : elle affecte la stabilité de l'ARNm du TNF (Kawai, 2010). Ainsi l'activation TLR est à l'origine de son rétrocontrôle, et la présence continue d'agonistes de TLR tels que le LPS (ou leur ré-administration) n'induit pas d'inflammation excessive. Ce phénomène est défini par le terme de tolérance aux endotoxines initialement décrit en 1940 par Paul Beeson.

Finally, l'élimination des MAMP contribue à l'extinction de la signalisation. Par exemple, il a été montré que l'activation par le LPS induisait l'internalisation du complexe TLR4/LPS puis sa dégradation (Saitoh, 2009). Ce phénomène d'internalisation a également été observé pour la flagelline et TLR5, sur des cellules épithéliales intestinales (Eaves-Pyles, 2011; Letran, 2011). Ainsi la flagelline est dégradée suite à sa reconnaissance de par le TLR5, et sa translocation vers le compartiment baso-latéral n'a pas été observée.

- Reconnaissance TLR-agoniste

La structure des récepteurs TLR, de même que la base structurale de leur interaction avec leurs MAMP respectifs ne sont pas entièrement comprises. En effet, de telles études nécessitent de produire les protéines TLR dans des systèmes d'expression, de les cristalliser avec ou sans MAMP, puis de définir leur structure par des études cristallographiques. Il est connu que les TLR sont fonctionnels à l'état d'homodimères (à l'instar de TLR4 ou TLR5) ou d'hétérodimères (TLR1/TLR2 ou TLR2/TLR6). La formation des dimères TLR est soit induite par le ligand (Li, 2012; Lu, 2012), soit constitutive (notamment pour TLR-8 et -9) (Tanji, 2013). De même la symétrie et la stoechiométrie des liaisons MAMP/TLR varient selon le TLR considéré (**Figures 2 et 4**). L'interaction du lipopolysaccharide (LPS) avec le récepteur TLR4 a été la plus largement étudiée. En plus de TLR4, elle nécessite un complexe de récepteurs solubles et/ou de surfaces notamment les co-récepteurs CD14 et MD2. Ainsi TLR4 forme un hétérodimère avec MD2, indépendamment de la présence de LPS. La liaison du LPS à MD2 ou au complexe TLR4/MD2 est facilitée par les protéines CD14 et LBP (LPS-binding protein). L'interaction entre le complexe LPS-MD-2 avec TLR4 présente un  $K_d$  de 3nM (Akashi, 2003). Malgré toutes les études menées ces 15 dernières années, les paramètres physico-chimiques des interactions de la plupart des TLR avec leurs ligands demeurent

encore mal documentés (O'Neill, 2009). Pour TLR9, il a été montré qu'un clivage protéolytique du domaine LRR s'effectue au niveau endolysosomal et est nécessaire à son activation par l'ADN bactérien. De plus ce clivage augmente l'affinité de liaison au CpG (Ewald, 2008).



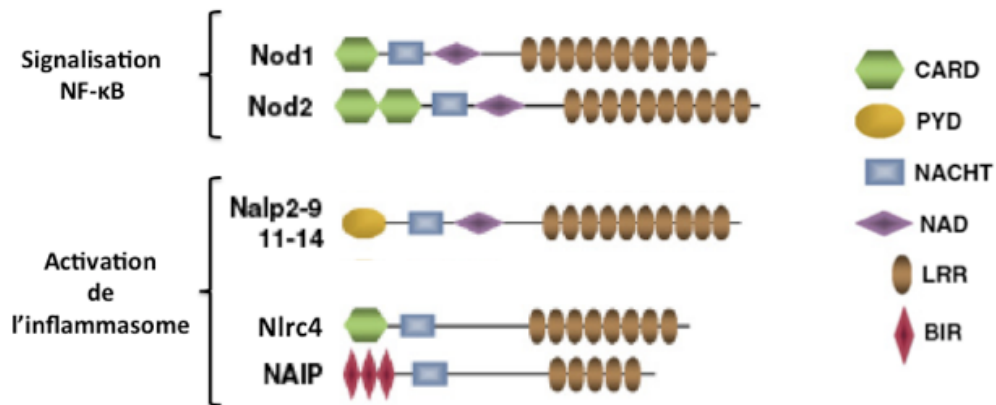
**Figure 4 : Symétrie et stoechiométrie de la liaison MAMP/TLR**

Des études de cristallographie ont permis d'étudier la structure des TLR et de leur liaison avec les MAMP. Seuls les domaines LRR des TLR sont représentés. Les TLR1/2 et TLR2/6 forment des hétérodimères tandis les TLR3, -4 et -5 forment des homodimères. Les dimères TLR1/2, TLR2/6 et TLR3 interagissent avec une molécule MAMP, leur stoechiométrie est dite 2:1. A l'inverse pour les TLR4 et TLR5, les homodimères LRR interagissent avec deux ligands et ont donc une stoechiométrie 2 :2.

Ces travaux ont permis de mieux comprendre la fonction des TLR et d'expliquer le rôle de différents LRR dans la reconnaissance de différents PAMP (Lu, 2012). Cependant, la structure de TLR7 et TLR9 de même que le mode de détection des DAMPs restent à déterminer.

### 1.1.2 "NOD-Like Receptors"

Les récepteurs NOD-(nucleotide binding and oligomerization domain)-like receptors (NLR) sont des PRR cytosoliques caractérisés par leur structure en domaines (ou modules) : un domaine N-terminal CARD, PYD ou BIR, un domaine NACHT (également appelé NOD), et un domaine C-terminal LRR (**Figure 5**). Chez l'Homme, au moins 23 NLR ont été répertoriés, et 34 chez la souris (Broz, 2013). La majorité des NLR initie l'assemblage de l'inflammasome mais certains signalent par la voie NF- $\kappa$ B (NOD1 et NOD2) (Broz, 2013).



**Figure 5 : Classification des NLR en fonction des modules exprimés**

L'organisation des modules CARD, PYD, NACHT, NAD, BIR et LRR varie selon le NLR considéré. Les récepteurs NOD1 et NOD2 sont incapables d'activer l'inflammasome et signalent via NF-κB. Les récepteurs Nalp sont désormais dénommés NLRP pour Nod-Like receptor with PYD domain. D'après (Benko, 2008).

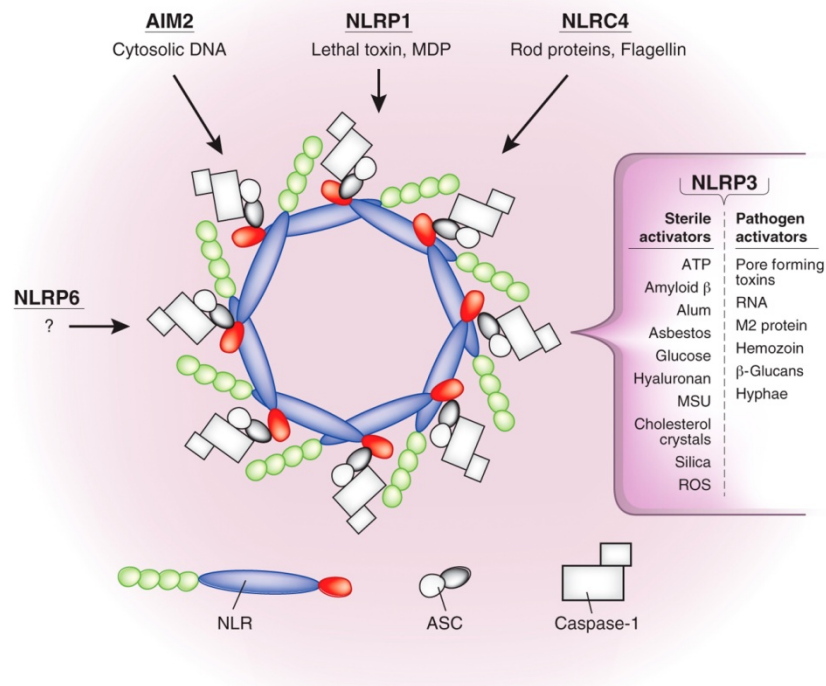
- NOD1 et NOD2

Les récepteurs cytosoliques NOD1 et NOD2 détectent des sous-unités du peptidoglycane bactérien: l'acide  $\gamma$ -D-glutamyl-meso-diaminopimelique des bactéries à Gram négatif (NOD1) et les motifs muramyl-dipeptide ou MDP des bactéries à Gram négatif ou positif (NOD2). Ces récepteurs reconnaissent des bactéries intracellulaires telles que *Listeria monocytogenes* ou *Mycobacterium tuberculosis*, mais aussi extracellulaires après l'injection cytosolique de fragments de peptidoglycane par des systèmes de sécrétion de type III ou de type IV (T3SS et T4SS) (*Helicobacter pylori* par exemple) (Kanneganti, 2007). L'activation de NOD1 et NOD2 nécessite le recrutement d'un adaptateur, appelé RIP2 (receptor-interacting protein 2), via des domaines CARD. Les voies de signalisation de NF-κB et MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) sont activées et produisent des cytokines et chimiokines telles que l'IL-12p70, le TNF $\alpha$ , l'IL-6, CXCL1 ou CXCL2 mais aussi des défensines (Fritz, 2006; Kersse, 2011). Plus récemment, Sabbah *et al.* ont montré que NOD2 pouvait également détecter de l'ARN simple brin viral, et induire la production d'IFN- $\beta$  via IRF3 (Sabbah, 2009). L'adaptateur mis en jeu est alors MAVS (Mitochondrial antiviral-signaling protein). Enfin, des mutations du gène codant pour NOD2 ont été associées à une susceptibilité pour la maladie de Crohn (Hugot, 2001). Récemment cette pathologie a été associée à une dysbiose, suggérant donc un rôle de NOD2 dans la détection et le maintien de la flore gastro-intestinale « saine » (Couturier-Maillard, 2013).

- Inflammasomes

Les inflammasomes sont des complexes cytosoliques, formés de 3 sous-unités : un récepteur de la famille des NLRs (NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP7, NLRP12, et NLRP4), l'adaptateur ASC (apoptotic speck protein), et la pro-caspase-1. La reconnaissance d'un PAMP ou d'un DAMP par le récepteur NLR déclenche son auto-agrégation et le recrutement

d'ASC par son domaine pyrine. Par son domaine CARD, ASC recrute la pro-caspase-1, dont la polymérisation est à l'origine de son propre clivage (Latz, 2013) (**Figure 6**). La caspase-1, fonctionnellement active, transforme la pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18 (produites suite à l'activation TLR) en leurs formes bioactives : IL-1 $\beta$  et IL-18. La sécrétion locale et systémique d'IL-1 $\beta$  et IL-18 exerce alors de puissants effets pro-inflammatoires. Par exemple, l'IL-1 $\beta$  induit le recrutement et l'activation de polynucléaires neutrophiles (PMN) (Chen, 2013) et son action sur le foie stimule la réponse de phase aigüe. De même l'IL-18 active les PMN et stimule la production d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T et les cellules NK.



**Figure 6 : Structure et assemblage des inflammasomes**

Les inflammasomes NLRP3, NLRC4, NLRP1, AIM2 et NLRP6 sont activés par des stimuli divers (MAMP ou DAMP). La détection de ces stimuli stimule la formation d'un complexe associant NLR, adaptateur ASC et caspase-1. D'après (Elinav, 2013).

NLRP3 reconnaît des motifs bactériens et viraux tels que l'ARN microbien, le MDP, les toxines microbiennes, mais aussi des DAMP tels que l'acide urique, l'ATP, la faible concentration cytosolique de potassium, ou encore la SAA (Ather, 2011 ; Broz, 2013; Chen, 2009). A l'homéostasie, l'ATP est intracellulaire, mais il est libéré au niveau extracellulaire lors de situations de nécrose, constituant ainsi un DAMP. L'ATP extracellulaire est connu pour stimuler le récepteur purinergique P2X7R ce qui provoque l'efflux spécifique du potassium cytosolique à travers le canal P2X7R. Ce dernier événement est responsable de l'activation de NLRP3 (Broz, 2013; Schroder, 2010). NLRP3 peut aussi être activé par la présence de PAMP au niveau cytosolique. Ces PAMP proviennent de pathogènes intracellulaires mais aussi de pathogènes extracellulaires phagocytés ou ayant injecté leurs facteurs de virulence via des systèmes de sécrétion de type III. L'activation du récepteur

NLRP3 pourrait être impliquée dans la mise en place des réponses immunitaires à certains vaccins/adjuvants ou encore dans certaines réponses allergiques (*cf* chapitre 3) (Ather, 2011; Besnard, 2011; De Gregorio, 2009).

En 2006, Miao *et al.* ont montré que NLRC4 (également appelé IPAF) détecte dans le compartiment cytosolique la présence de flagelline ou de protéines structurales "Rod" (Miao, 2006). Il est remarquable que les flagellines et les protéines Rod sont des constituants de systèmes de sécrétion de type III et induisent une signalisation similaire. NLRC4 détecte ainsi des bactéries flagellées telles que *Salmonella enterica serovar Typhimurium* ou *Legionella pneumophila*, mais aussi non flagellées telles que *Shigella* qui expriment un système de sécrétion de type III essentiel à l'invasion cellulaire. La flagelline ou les protéines Rod sont délivrées dans le cytosol par injection (comme pour les agonistes NOD1 et NOD2) ou après phagocytose suivi de lyse vacuolaire ou translocation de protéines. Chez la souris, la liaison de la flagelline ou de protéines Rod à NLRC4 requiert des co-récepteurs de la famille NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein), respectivement NAIP2 et NAIP5/6 (Broz, 2013). Chez l'Homme, un seul co-récepteur NAIP a été isolé, il reconnaît des sous-unités des systèmes de sécrétion de type III. Le motif moléculaire de la flagelline reconnu par NLRC4 est différent de celui de TLR5. En effet, *in vitro*, il a été montré que des mutations dans la partie C-terminale de la flagelline (en particulier des délétions de quelques acides aminés C-terminaux) abroge la production d'IL-1 par des macrophages en réponse à la flagelline (Miao, 2010). Le système immunitaire accroit sa capacité à détecter des bactéries flagellées en ciblant 2 compartiments cellulaires via TLR5 et NLRC4-NAIP5/6 et 2 motifs distincts au sein des flagellines bactériennes. De plus, un tel système à 2 composantes favorise la coopération: la flagelline extracellulaire est tout d'abord reconnue par TLR5 et induit la production de pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18 ; puis l'activation de NLRC4 opère dans les contextes d'invasion et/ou dissémination bactérienne en générant les cytokines matures (IL-1 $\beta$  et IL-18) dont le potentiel anti-infectieux est important (Dinarello, 2009). Ce système permettrait également de maintenir une réponse immunitaire soutenue lors d'infections persistantes qui provoqueraient la désensibilisation de TLR5 (Chen, 2009).

### 1.1.3 "RIG-I-like receptors"

A l'heure actuelle, trois RIG-I-like récepteurs (RLR) ont été décrits : RIG-I (retinoic acid-inducible gene I), MDA5 (melanoma differentiation associated factor 5) et LGP2 (laboratory of genetics and physiology 2 and a homolog of mouse D11lgp2). Ils se caractérisent par la présence d'un domaine central « DEAD helicase » capable de lier et d'hydrolyser l'ATP, mais aussi d'un domaine CARD interagissant avec la protéine adaptatrice MAVS (également appelée IPS (IFN- $\beta$  promoter stimulator)-1). Tout comme les NLR, les récepteurs RLR sont exprimés dans le cytosol de nombreuses cellules hématopoïétiques mais aussi de cellules structurales, et permettent la détection des ARN viraux doubles brins naturels et synthétiques (poly(I:C) par exemple) (Loo, 2011). La cascade

de signalisation médiée par les récepteurs RLR conduit à l'expression de nombreux gènes de défense anti-virale codant les IFN de type I, de gènes stimulés par les interférons (interferon stimulated genes, ISG) et de gènes codant des cytokines pro-inflammatoires (Dixit, 2013). Les RLR utilisent les facteurs de transcription IRF3, IRF7 et NF- $\kappa$ B.

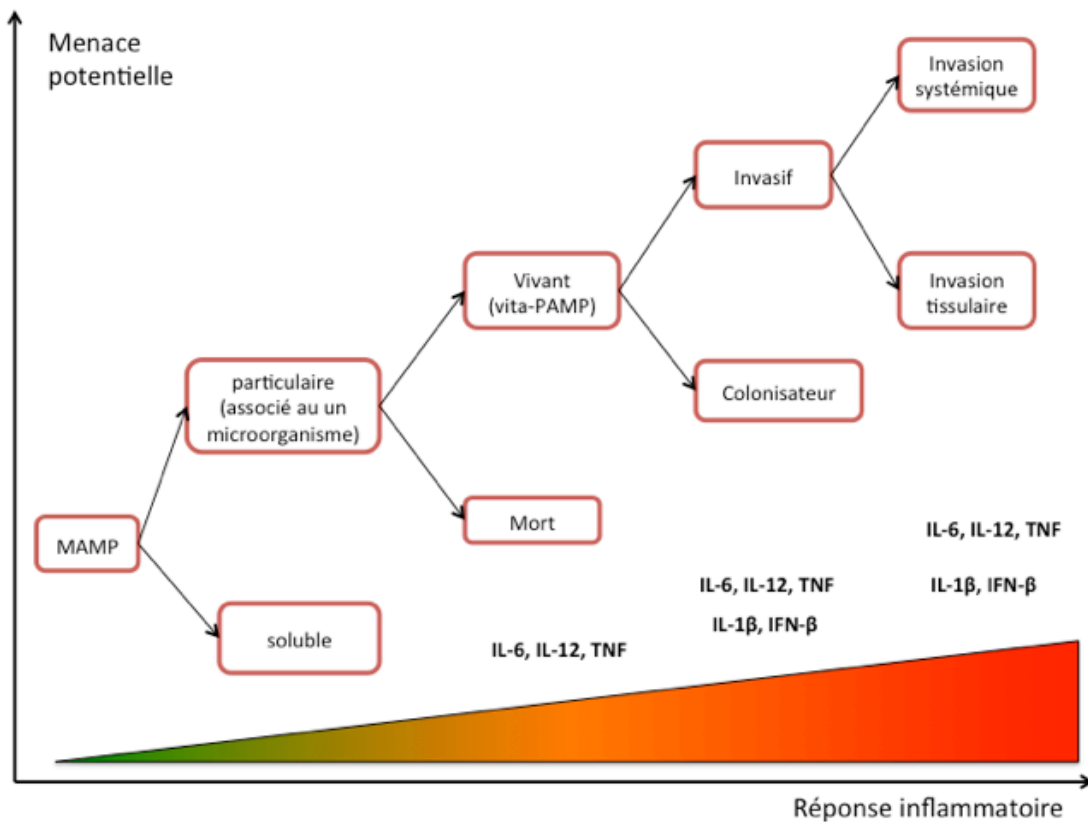
#### 1.1.4 "C-type Lectin Receptors"

Les récepteurs lectiniques de type C (C-type lectin receptors, CLR) sont des récepteurs spécialisés dans la détection de saccharides exprimés par les champignons, mais aussi les bactéries et les virus. Ces récepteurs peuvent être exprimés au niveau transmembranaire (dectin-1, dectin-2, mincle, DC-SIGN, MMR (macrophage mannose receptor)) ou sous forme soluble (SP (surfactant protein)-A, SP-D et MBP (mannose-binding protein)). Ces derniers ont principalement une fonction d'opsonisation (Takeuchi, 2010). La reconnaissance de motifs osidiques par des CLR membranaires participe au processus de phagocytose et entraîne par ailleurs l'activation des facteurs de transcriptions NF-AT, NF- $\kappa$ B et MAPK, aboutissant à la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines (Hardison, 2012). En particulier, l'activation CLR dans les APC, stimule la production d'IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-23. Ces cytokines sont impliquées dans la différenciation des lymphocytes Th17, cellules clés dans la lutte contre les infections fongiques (Hardison, 2012).

#### 1.1.5 Ajustement de la réponse immunitaire à la menace microbienne

La simple détection de MAMP par le système immunitaire ne préjuge pas de la menace réelle représentée par le microorganisme. Par exemple, des MAMP similaires sont exprimés entre pathogènes et commensaux ou entre micro-organismes vivants et morts. Le système immunitaire a mis en place différents points de contrôles afin d'effectuer ces distinctions (Blander, 2012) (**Figure 7**). Tout d'abord la présence de multiples MAMP délivrés par les pathogènes permet d'établir un code barre signant précisément la complexité du micro-organisme. De plus, la localisation des microorganismes, la nature et le profil d'expression de PRR de leurs cibles cellulaires apportent des informations additionnelles sur la virulence ou l'innocuité. L'engagement de divers PRR extra- puis intra-cellulaires permet d'établir une graduation du potentiel invasif et répliatif d'un pathogène et de définir avec une grande sensibilité la sévérité du danger auquel fait face le système immunitaire. Cette stratégie permet à partir d'un nombre limité de récepteurs de développer une réponse inflammatoire adaptée au pathogène ciblé (Underhill, 2007). A l'exception de quelques PRR, il n'est pas clairement défini si la combinatoire de reconnaissance n'est pas également sous la dépendance de molécules accessoires ou de co-récepteurs. La détection multiple MAMP-PRR est également importante afin de contrer les mécanismes d'échappement développés par les pathogènes. Par ailleurs, les ARNm sont la signature d'une activité physiologique dans le microorganisme et permettent d'établir que ce dernier est vivant et par conséquent plus à même de provoquer une infection et des dommages à l'hôte. Le terme de vita-PAMP a été

proposé pour ces PAMP dont l'expression est restreinte aux microorganismes vivants (Blander, 2012).



**Figure 7 : Réponse immunitaire innée en fonction du pathogène et de sa menace potentielle**

Chaque nœud représente un point de contrôle déterminant l'intensité de la réponse immunitaire associé au pathogène détecté. Le type et la quantité de cytokines pro-inflammatoires secrétées sont fonction de cette menace. D'après (Blander, 2012).

La synergie entre PRR a été montrée *in vitro* entre NOD2 et TLR2, mais aussi TLR3, TLR4 et TLR9 (Netea, 2005; van Heel, 2005). La combinaison des deux MAMP (MDP et Pam3Cys) démultiplie la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires par les cellules mononuclées du sang. Une synergie entre la signalisation TLR2 et dectin-1 a également été montrée dans les macrophages et les DC, se caractérisant par une augmentation notable de la production de cytokines et/ou d'espèces réactives de l'oxygène (Gantner, 2003). De façon intéressante, cette activité est dépendante de la cinétique d'ajout des agonistes de PRR (Napolitani, 2005). Enfin la différenciation des lymphocytes CD4<sup>+</sup> peut être modulée en fonction de la nature des agonistes TLR stimulant les DC (Napolitani, 2005). En effet, l'ajout de R848 (agoniste de TLR8) au LPS (agoniste de TLR4) favorise la polarisation Th1 des lymphocytes (diminution de la production d'IL-4 au profit de l'IFN- $\gamma$ ) par rapport au LPS seul. De façon similaire, les agonistes de TLR3 et TLR4 seuls stimulent la production de CXCL10 et d'IL-12p35 par les DC (orientation Th1) alors qu'en présence d'un agoniste de



TLR2, une inhibition dépendante de l'IL-10 est observée (orientation T régulatrice) (Re, 2004).

### 1.1.6 Utilisations précliniques et cliniques des agonistes de la réponse innée

La détection MAMP/PRR est donc l'événement clé initiant la mise en place d'une réponse immunitaire innée et adaptative. Ces récepteurs, en particulier TLR et NLR, constituent donc des cibles de choix pour des approches immuno-thérapeutiques. Ainsi les agonistes TLR et NLR ont rapidement émergé comme molécules candidates pour manipuler l'immunité innée (lutte contre les infections virales et bactériennes ou contre les tumeurs) et l'immunité adaptative (vaccins, traitement de l'asthme ou de maladies auto-immunes). De nombreux ligands synthétiques de PRR présentant une innocuité ou une toxicité réduite par rapport à des ligands naturels ont été et sont encore développés dans ce but (**Tableau 3**). L'utilisation des agonistes TLR ou NLR en tant qu'adjuvants de la vaccination sera détaillée dans le chapitre 3 de ce manuscrit.

**Tableau 3 : Agonistes des PRR en développement clinique pour moduler l'immunité innée**

Drug	Target and activity	Application	Phase of development	Companies
Imiquimod <sup>121</sup>	TLR7 agonist	Keratosis, basal cell carcinoma, HPV-associated genital warts	Clinical	Graceway Pharmaceuticals, iNova Pharmaceuticals, Mochida Pharmaceutical
MPL <sup>122,123</sup>	TLR4 agonist	Adjuvant in the Cervarix (GlaxoSmithKline) vaccine against HPV infections and associated cervical cancer	Clinical	GlaxoSmithKline
Luivac (lysate of a combination of bacterial species) <sup>18,19</sup>	Agonist for various TLRs	Recurring respiratory tract infections	Clinical	Daiichi Sankyo
CADI-05 (heat-killed <i>Mycobacterium indicus pranii</i> ) <sup>15</sup>	Agonist for various TLRs	Leprosy (in combination with antimicrobial drugs) and tuberculosis	Clinical and Phase III	Cadila Pharmaceuticals
CpG-7909 (REF.16)	TLR9 agonist	Improving the efficacy of the anthrax vaccine BioThrax (Coley Pharmaceutical)	Phase II	Coley Pharmaceutical
DIMS-0150 (an oligonucleotide-based drug) <sup>17</sup>	TLR9 agonist	Steroid-resistant ulcerative colitis	Phase III	InDex Pharmaceuticals
E-5564 (eritoran)	TLR4 antagonist	Sepsis	Phase III	Eisai Pharmaceuticals
TAK-242 (resatorvid)	TLR4 antagonist	Sepsis	Suspended in Phase III	Takeda Pharmaceutical
MF-59 (squalene and water emulsion) and MTP-PE (mifamurtide)	NOD2 agonist	HIV, influenza viruses	Phase I	Chiron/Novartis

HPV, human papillomavirus; MPL, monophosphoryl lipid A; MTP-PE, phosphatidylethanolamine-linked muramyl tripeptide; NOD2, nucleotide-binding oligomerization domain-containing 2; TLR, Toll-like receptor.

D'après (Hancock, 2012)

Dans le cadre d'infections virales, la production d'IFN de type I permet d'induire la synthèse de protéines antivirales et de limiter l'infection de nouvelles cellules. Les agonistes de TLR-3,-7,-8 et -9 permettent d'augmenter cette réponse et de diminuer la charge virale lors d'infection herpétiques ou d'hépatites (Hedayat, 2011). L'activation du système immunitaire inné peut être utilisée en synergie avec des traitements ciblant directement le virus. Par exemple la spécialité Ampligen® (Hemispherx Biopharma) associe un dérivé synthétique

d'ADN double brin (PolyI:polyC<sub>12</sub>U) et la zidovudine (anti-viral inhibant la transcriptase inverse du VIH) dans le traitement du VIH.

L'immunité anti-tumorale repose sur des réponses immunitaires de type Th1 et cytotoxiques (CTL). Ainsi les agonistes des TLR-3,-7,-8 et-9 sont les plus développés dans cette indication. Des agonistes de TLR-2, -4 et-5 sont également en cours de développement. En effet l'activation TLR/TLR4 permet l'apoptose de cellules tumorales résistantes à la chimiothérapie grâce à la production de TNF- $\alpha$  et d'oxyde nitrique (Hennessy, 2010).

Enfin la réponse TLR peut être associée à une réponse inflammatoire non contrôlée et délétère, par exemple lors de chocs septiques. Des stratégies visant à empêcher l'interaction entre TLR4 et le LPS ont donc été développées (par exemple administration d'antagonistes synthétiques de TLR4, d'anticorps ciblant TLR4, de récepteurs TLR4/MD-2 solubles) (Hedayat, 2011).

## 1.2 LE ROLE CENTRAL DES CELLULES PRESENTATRICES D'ANTIGENE DANS L'IMMUNITE ADAPTATIVE

Il y a plus de 30 ans, Charles Janeway avait postulé que l'activation de l'immunité innée via les PRR était indispensable à l'émergence de la réponse adaptative spécifique d'antigènes purifiés (Janeway, 1989). La détection des MAMP par les cellules présentatrices d'antigène (APC) les place au centre du couplage de l'immunité innée et adaptative. Ainsi les APC stimulées par les PRR produisent des médiateurs de l'immunité innée et de façon concomitante s'engagent dans un processus de maturation, *i.e.* d'activation fonctionnelle (Palm, 2009). Cette maturation génère des APC matures qui sont les seules cellules capables de présenter les antigènes aux lymphocytes T et B naïfs.

### 1.2.1 Ontogénie et classification des phagocytes mononucléés : DC et monocytes

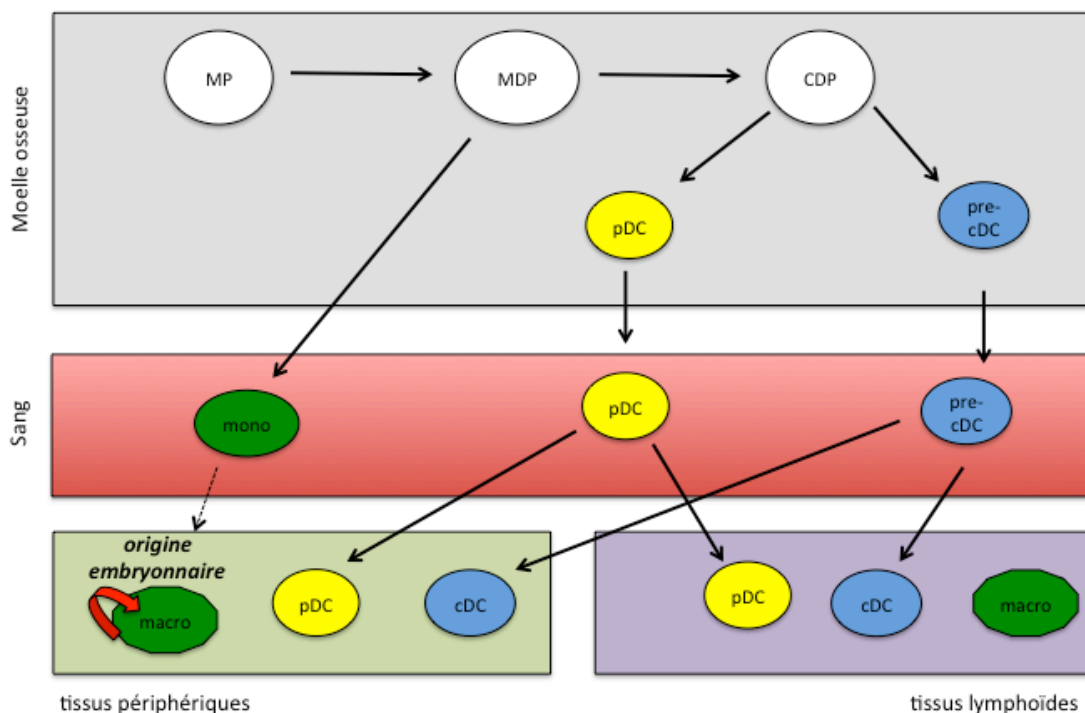
Les APC les plus efficaces dans la stimulation de l'immunité adaptative sont les DC. Les DC se caractérisent généralement par l'expression de CD11c et de MHCII mais peuvent être encore déclinées en plusieurs populations d'ontogénies, de phénotypes et de fonctions distinctes. Ces différentes populations de DC sont dérivées de la lignée des DC conventionnelles ou classiques (cDC) et de celle des monocytes (moDC). Discriminer cDC, monocytes et moDC, en particulier durant les processus inflammatoires, n'est pas une tâche aisée. Ce chapitre fait un état des lieux des récentes découvertes et évolutions dans ce domaine.

- Ontogénie des DC et monocytes

A l'instar de toutes les cellules hématopoïétiques, les précurseurs des monocytes et des DC logent dans la moelle osseuse (**Figure 8**). A l'origine de ces cellules se trouvent des précurseurs myéloïdes (*myeloid progenitor*, MP et *macrophage/DC progenitor*, MDP). La

cellule MDP donne ensuite naissance aux monocytes et aux précurseurs communs aux différentes populations de DC, appelés CDP. Les monocytes naissants qui expriment constitutivement CCR2 migrent alors vers le sang sous l'impulsion d'un gradient de CCL2 (Serbina, 2006). A partir du stade CDP émergent les DC plasmacytoïdes (pDC) et les précurseurs de DC classiques ou conventionnelles (pre-cDC). Les pre-cDC migrent de la moelle osseuse vers la circulation sanguine afin de rejoindre ensuite les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes ou ils se différencient en cDC (Geissmann, 2010). Le facteur de croissance "Colony-Stimulating Factor 1" (CSF1 ou M-CSF [macrophage-CSF]) favorise la différenciation des MDP vers la lignée monocyttaire, tandis que Flt3L (Fms-Related Tyrosine Kinase 3) est essentielle au développement des cDC et des pDC (Merad, 2013).

Initialement, les monocytes étaient décrits comme les précurseurs de macrophages tissulaires à l'état basal et inflammatoire. Des données récentes ont démontré que les macrophages tissulaires dérivent en majorité d'un précurseur fœtal qui se multiplie de façon autonome dans les tissus (Hashimoto, 2013). Ainsi la contribution des monocytes circulants au maintien des populations de macrophages tissulaires est minoritaire voire inexistante.



**Figure 8 : Origine et homéostasie des cellules dendritiques et monocytes**

Les cDC, pDC, macrophages et monocytes inflammatoires ou résidents (*patrolling*) dérivent de précurseurs MP (*myeloid progenitor*) de la moelle osseuse. Les cellules MP se différencient en MDP (*macrophage/DC progenitor*) et engendrent les monocytes et les CDP (*common DC progenitor*) qui sont à l'origine des pDC et des pré-cDC. Les pDC, pré-DC et monocytes transitent vers le sang puis dans les tissus périphériques et les organes lymphoïdes. Les macrophages des tissus dérivent majoritairement de précurseurs fœtaux et s'auto-renouvellent. Les monocytes circulants ont une contribution minimale au maintien du pool de macrophages tissulaires. Mono : monocytes ; macro : macrophages. Adapté de (Geissmann, 2010; Segura, 2013).

- Classification et marqueurs discriminants des cDC et moDC

A l'homéostasie, les DC ( $CD11c^{+}MHCII^{+}$ ) des tissus sont principalement d'origine cDC ou pDC. Dans les tissus non lymphoïdes, tels que le poumon, l'intestin ou la peau, les marqueurs  $CD11b^{+}$  et  $CD103^{+}$  permettent de discriminer différentes populations de cDC sentinelles (**Tableau 4**). Dans les tissus lymphoïdes, les cDC regroupent 3 populations  $CD4^{+}$ ,  $CD8^{+}$  et les cellules doubles négatives  $CD4^{neg}CD8^{neg}$  (Heath, 2009). Heath et Carbone ont proposé de classer les cDC des tissus non lymphoïdes et lymphoïdes en 2 catégories qui tiennent compte de leur ontogénie et fonction (**Tableau 4**). Ainsi, les cDC  $CD11b^{+}$  regroupent les cDC  $CD4^{+}$  et doubles négatives des tissus lymphoïdes, les cDC  $CD11b^{+}$  des tissus non lymphoïdes et les DC  $CD11b^{+}CD103^{+}$  de l'intestin. Les cDC  $CD103^{+}$  rassemblent les cDC  $CD8^{+}$  des tissus lymphoïdes et les DC  $CD103^{+}$  des tissus non lymphoïdes. Cette filiation est conservée à travers les mammifères car des populations homologues ont également été définies chez l'Homme (Merad, 2013).

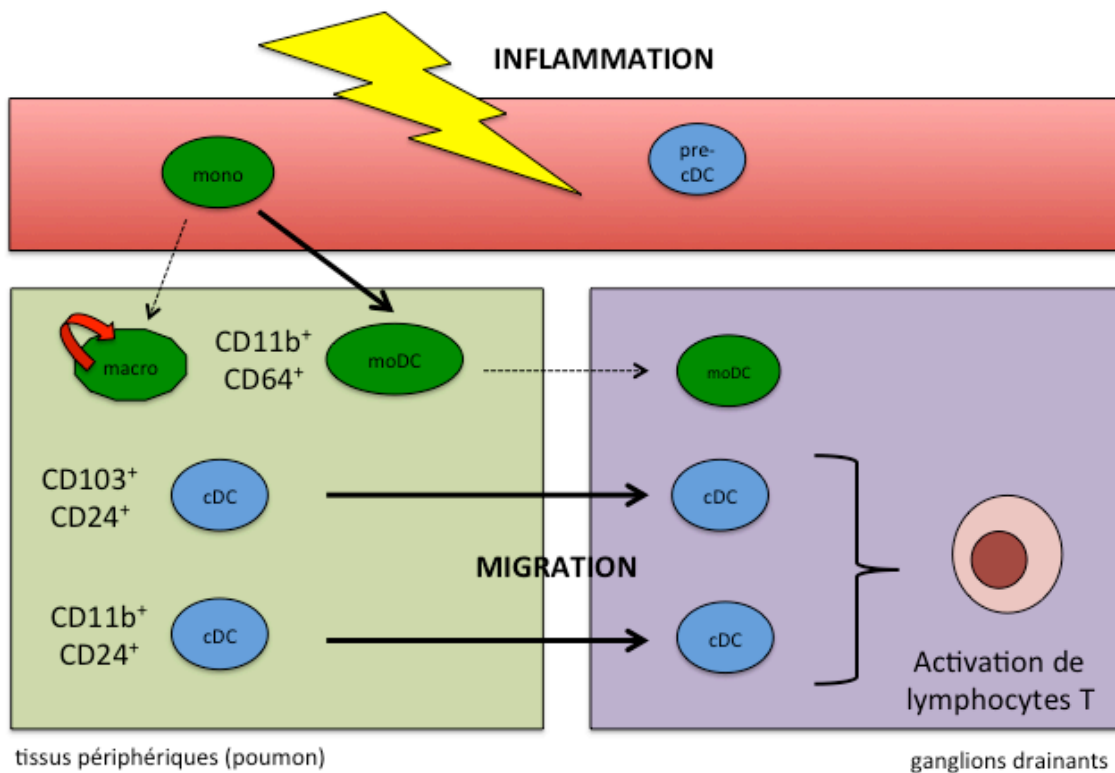
**Tableau 4 : Filiation des populations de cellules dendritiques murines et humaines**

	pDC	cDC $CD8^{neg}$	cDC $CD8^{+}$	moDC
Facteurs de différenciation	Flt3L, E2-2, Irf8	Flt3L, Notch2	Flt3L, Batf3, Id2, Irf8	Csf-1
Population lymphoïde	$B220^{+}$	$CD4^{+}$ et $CD4^{-}CD8^{-}$	$CD8^{+}$	$CD11b^{+}CD64^{+}$
Population non lymphoïde	$B220^{+}$	$CD11b^{+}CD24^{+}$	$CD103^{+}$	
Expression TLR / NLR	TLR7, TLR9	TLR9, RIG-1, MDA5, NOD1, NLRC4	TLR3, TLR11, TLR9, TLR13	n.d.
Equivalent chez l'Homme	$CD303^{+}$ (BDCA-2)	$CD1c^{+}$ (BDCA-1)	$CD141^{+}$ (BDCA-3)	$CD14^{+}$
Différenciation in vitro	Flt3L			GM-CSF + IL-4
Principale fonction	immunité innée	immunité adaptative $CD4^{+}$	immunité adaptative $CD8^{+}$	effecteur inné, réponse mémoire

Les cellules du système des phagocytes mononucléés des tissus lymphoïdes et non lymphoïdes sont présentées dans ce tableau. Les marqueurs exprimés par les familles de pDC, cDC et moDC, définies selon Carbon et Heath, ainsi que leurs principaux facteurs de différenciations ont été repris de façon non exhaustive. n.d. : non déterminé. Adapté de (Hashimoto, 2011; Heath, 2009; Merad, 2013).

Les monocytes circulants expriment tous  $CD11b$  mais sont répartis en 2 catégories en fonction de leur expression du marqueur  $Ly6C$  (Geissmann, 2010). Les monocytes classiques ou inflammatoires  $Ly6C^{+}$  sont majoritaires, s'infiltrant rarement dans les tissus à l'homéostasie mais sont massivement recrutés dans les tissus lors de situations de stress, infectieuses ou stériles. En effet, le tissu endommagé produit des chimiokines telles que

CCL2 qui stimulent l'infiltration des monocytes inflammatoires dans un mécanisme dépendant de CCR2. Au contraire, les monocytes dits résidents ("patrolling") n'expriment pas (ou peu) Ly6C et sont recrutés dans les tissus sous la dépendance de CX3CR1 (Geissmann, 2003). Ces monocytes résidents participent au processus de réparations tissulaires et suppriment les réponses inflammatoires. Les monocytes inflammatoires entrant dans les tissus peuvent acquérir l'expression de CD11c et MHCII et perdre celle de Ly6C et présentent alors le phénotype de DC CD11b<sup>+</sup> (Guilliams, 2013). Ces « DC dérivées de monocytes » ou moDC sont appelées de façon générique DC inflammatoires. *In vivo*, ces moDC peuvent générer des TipDC (TNF- $\alpha$ -iNOS [inducible nitric oxide synthase]-producing DC), ayant une très forte activité anti-microbienne lors d'infections à *Listeria monocytogenes* (Serbina, 2003). Puisque les moDC restent très proches phénotypiquement des cDC CD11b<sup>+</sup>, de récentes études ont été conduites pour préciser le phénotype et les fonctions respectives de ces 2 populations (**Figure 9 et Tableau 4**).



**Figure 9 : Phagocytes mononucléés à l'état inflammatoire**

En contexte infectieux ou inflammatoire, les monocytes Ly6C<sup>+</sup> infiltrent les tissus non lymphoïdes et se différencient en DC appelées moDC. Les cDC CD103<sup>+</sup> et CD11b<sup>+</sup> migrent dans les ganglions drainants et y activent les lymphocytes T. Comparativement aux cDC, la migration des moDC est plus faible et retardée dans le temps. Les monocytes résidents (exprimant CX3CR1) et les DC résidentes des ganglions ne sont pas représentés sur ce schéma.

- Vers une définition phénotypique et transcriptionnelle des cDC et moDC

Le facteur de transcription Zbtb46 a récemment été isolé en tant que facteur spécifique des cDC (ou zDC). Ainsi il est désormais possible de distinguer ou de dépléter

spécifiquement les cDC (les 2 populations CD11b<sup>+</sup> et CD103<sup>+</sup>), respectivement grâce à des souris « GFP knock-in » et des souris zDC-DTR (Meredith, 2012; Satpathy, 2012). Cheong *et al.* avait initialement proposé le marqueur DC-SIGN (CD209a) comme spécifique des moDC (Cheong, 2010). Cependant les DC exprimant DC-SIGN expriment également Zbtb46 et ne peuvent à ce titre être définies en tant que moDC.

Le Consortium ImmGen a recherché des spécificités dans la signature transcriptionnelle de chacune des populations de phagocytes mononucléés de divers tissus. L'étude a été standardisée à l'aide de populations caractéristiques de macrophages et de cDC (Gautier, 2012; Miller, 2012). Une certaine hétérogénéité des DC CD11b<sup>+</sup> a été mise en évidence. Le récepteur FcγRI ou CD64 a été identifié en tant que marqueur spécifique des macrophages, monocytes et moDC (**Figure 9**). Ainsi, il a été établi que les DC CD11b<sup>+</sup> des tissus non lymphoïdes (poumon et lamina propria intestinale) sont constituées d'un mélange de cDC et de moDC à l'homéostasie. De plus les « DC CD11b<sup>+</sup> CD103<sup>neg</sup> » de la lamina propria ont rapprochées de la lignée des monocytes/macrophages (Gautier, 2012). Bien que cette approche ait été critiquée par David Hume (Hume, 2013), elle a révélé une nouvelle stratégie d'analyse pour discriminer les DC et monocytes/macrophages et les fonctions associées à ces cellules.

Au niveau pulmonaire, l'utilisation des marqueurs CD64, Mar-1 (chaîne α du récepteur FcεR1) et CD24 (heat stable antigen) ont été proposés pour distinguer les moDC des cDC (Langlet, 2012; Plantinga, 2013) : les cDC CD11b<sup>+</sup> expriment CD24 tandis que les moDC expriment CD64 et Mar-1. Cette distinction phénotypique a été confirmée par des analyses ontogéniques. En effet, les moDC dépendent du CSF-1R à l'instar des monocytes/macrophages et les cDC de Flt3 (Schlitzer, 2013). Par ailleurs, dans un modèle d'asthme, il a été mis en évidence que le recrutement de moDC dans le poumon dépend de CCR2 (Plantinga, 2013). Ainsi, les signatures moléculaires et l'ontogénie ont permis de cerner la plasticité phénotypique des populations de DC et monocytes/macrophages.

### 1.2.2 Rôles des cellules du système des phagocytes mononucléés dans l'immunité

Les monocytes inflammatoires sont primordiaux dans la clairance microbienne. L'utilisation de souris *Ccr2*<sup>-/-</sup> a souligné leur rôle dans l'immunité anti-virale, anti-bactérienne, anti-parasitaire et anti-fongique. Ainsi, ces animaux sont plus sensibles à des infections à *Listeria monocytogenes* ou *Toxoplasma gondii* (Shi, 2011). Le plus souvent, la protection est dépendante de la production d'oxydes nitriques et/ou d'IFN de type I par les Tip-DC (dérivées des monocytes) qui infiltrent le tissu infecté. Cependant, un recrutement excessif de monocytes peut s'avérer délétère. Ainsi, lors d'infections grippales, l'inhibition partielle du recrutement des Tip-DC par un traitement pharmacologique améliore le pronostic vital des animaux, alors que la charge virale n'est pas affectée (Aldridge, 2009). Durant les infections, les monocytes inflammatoires peuvent être mobilisés dans les ganglions drainants

directement à partir du sang ou après émigration du tissu périphérique infecté (Dominguez, 2010; Nakano, 2009; Shi, 2011). Au niveau des muqueuses vaginales (Iijima, 2011) et pulmonaires (Plantinga, 2013), les moDC sont impliquées dans la réactivation locale des lymphocytes Th1 et Th2, respectivement dans des modèles d'infection herpétiques et d'asthme allergique. Cependant, *in vivo*, l'induction des réponses T par les monocytes inflammatoires semble peu probable. En effet, les cDC CD11b<sup>+</sup> CD24<sup>+</sup> du poumon présentent des capacités de migration supérieures comparées aux moDC CD64<sup>+</sup> (Plantinga, 2013; Schlitzer, 2013) et semblent plus efficaces dans l'induction de la prolifération des lymphocytes T (Schlitzer, 2013).

La famille des cDC CD8<sup>+</sup> est spécialisée dans les fonctions de cross-présentation et donc dans l'induction de réponses T cytotoxiques (del Rio, 2010). Cette fonction peut être associée à la capture de particules virales par ces DC, mais aussi à la capture de cellules apoptotiques infectées (Heath, 2009; Villadangos, 2007). Au niveau pulmonaire, la capture sélective des corps apoptotiques a été associée à la forte expression du TLR3 par les DC CD103<sup>+</sup> (Desch, 2011). De plus, l'expression de transcrits liée à la voie de dégradation du MHC I (par exemple *Tap1/2*) est particulièrement forte dans ces cellules. De même, chez l'Homme (Poulin, 2012) et chez la souris (Zelenay, 2012) l'expression massive du récepteur de type lectine Clec-9A par les DC CD8<sup>+</sup> a été associée à la capture d'antigènes nécrotiques et à l'activation CTL. Cette spécificité de présentation antigénique aux cellules T CD8<sup>+</sup> est donc une propriété intrinsèque de cDC CD8<sup>+</sup>. Cependant la réactivation de CTL mémoires par les DC CD8<sup>+</sup> est limitée (del Rio, 2010). A l'inverse des DC CD8<sup>+</sup>, le groupe des DC CD4<sup>+</sup> est spécialisé dans l'induction de réponses T CD4<sup>+</sup>: la voie de dégradation antigénique du MHC II y est prépondérante (Desch, 2011). Au niveau pulmonaire, Cook *et al.* ont suggéré des rôles distincts des DC CD11b<sup>+</sup> et CD103<sup>+</sup>, respectivement dans l'induction de réponses Th1 et Th2 (Nakano, 2012). Ces différences ont pu être reliées à une capture de l'antigène ovalbumine plus efficace par les DC CD11b<sup>+</sup>, via le récepteur au mannose. Enfin, *in vitro*, la quantité d'antigène captée par les DC CD103<sup>+</sup> semble influencer la différenciation vers une réponse Th2 ou Th17 (Nakano, 2012).

Ontogéniquement, les DC plasmacytoïdes (pDC) se différencient précocement des cDC et présentent des fonctions différentes. Ainsi, elles jouent un rôle essentiel lors des infections virales: l'activation du TLR7 induit la production d'IFN de type I. Ainsi les fonctions immunomodulatrices des pDC priment sur leurs fonctions de présentation antigénique (Guilliams, 2013; Villadangos, 2008).

### 1.2.3 Principales fonctions des cellules dendritiques

L'activation de la réponse adaptative peut se diviser en cinq grandes phases: (1) la capture de l'agent pathogène par les DC (2) la maturation fonctionnelle des DC, (3) la migration des DC vers les ganglions drainants, (4) l'activation de lymphocytes spécifiques

des antigènes du pathogène dans les tissus lymphoïdes et (5) la migration des effecteurs lymphocytaires au site d'infection. Parmi les APC, les DC, cellules initialement décrites par Ralph Steinman, sont les plus efficaces dans l'activation de réponses adaptatives.

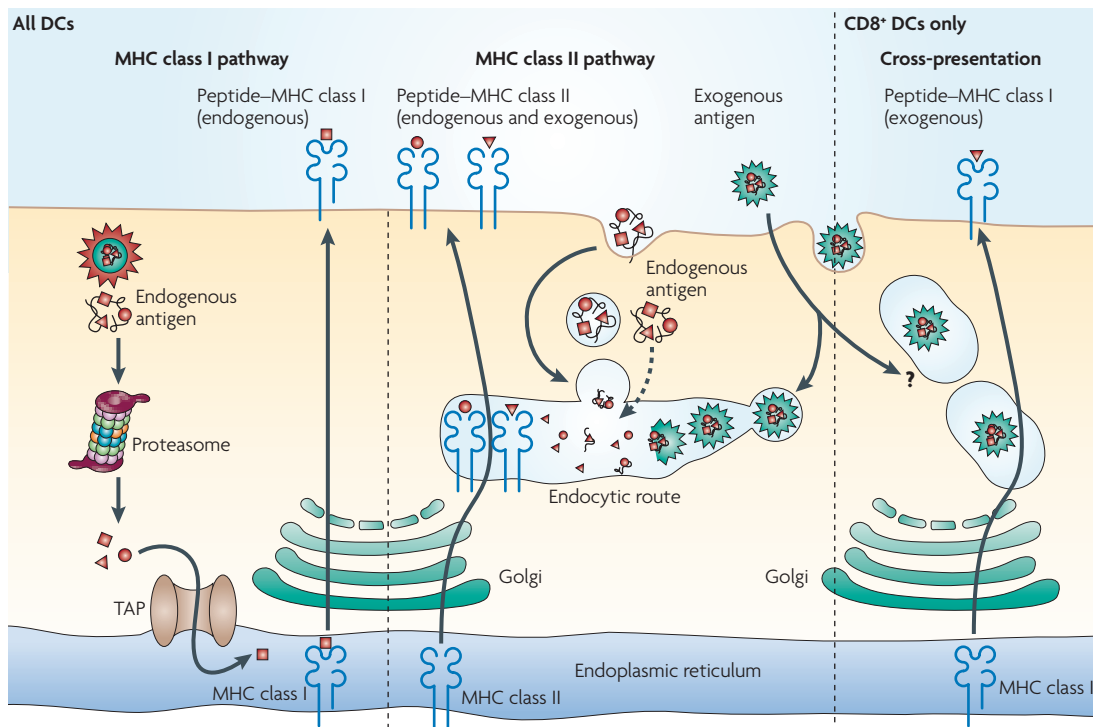
- Capture antigénique

A l'état immature, les DC se caractérisent par une morphologie comprenant de nombreuses extensions appelées dendrites. Ainsi, ces cellules peuvent facilement échantillonner l'environnement, capturer des antigènes, par phagocytose, endocytose ou pinocytose (Wilson, 2005). La phagocytose s'applique aux particules de grande taille telles que des bactéries ou des cellules mortes et requiert des récepteurs exprimés en surface. Au contraire les antigènes solubles sont capturés par pinocytose. Enfin, à l'instar de la phagocytose, l'endocytose utilise des CLR (CD205, DCIR2), ou des récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines (Villadangos, 2007), et internalise l'antigène dans des vésicules à clathrine.

- Apprêtement des antigènes et cross-présentation

La présentation d'antigènes d'origine peptidique aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> est respectivement conditionnée à l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) de classe II et MHC de classe I (**Figure 10**) (Villadangos, 2007). Les peptides endogènes sont présentés dans le contexte du MHCI, c'est le cas des peptides de pathogènes intracellulaires (virus ou bactéries intracellulaires) mais aussi de peptides du soi mutés (peptides tumoraux par exemple). Les peptides exogènes sont présentés par le MHCII. Les antigènes endogènes et exogènes suivent des voies de dégradation différentes. Les protéines cytosoliques sont dégradées par l'immunoprotéasome et entrent dans le réticulum endoplasmique via la protéine TAP, où s'effectue le chargement des peptides antigéniques dans le sillon d'une molécule de MHCI. Cependant, les protéines exogènes sont généralement capturées puis dégradées dans des voies endolysosomales, et sont chargées sur une molécule de MHCII. Le plus souvent les antigènes sont intégralement associées à des particules microbiennes et sont libérés dans un processus de phagocytose et une dégradation des particules dans le compartiment phagolysosomal. Les peptides associés aux molécules de MHC sont transportés à la surface cellulaire afin d'être présentés aux cellules T CD4 et CD8. Les cDC CD8<sup>+</sup> sont capables de présenter un antigène exogène dans le contexte du MHCI : cette fonction est appelée présentation croisée ou "cross-présentation" (Villadangos, 2007). Les mécanismes aboutissant à la présentation d'antigènes exogènes dans le contexte du MHCI sont variables (**Figure 10**). Cette fonction présente l'avantage d'induire des réponses T cytotoxiques vis-à-vis d'antigènes exogènes et est utilisée comme concept pour le développement de vaccins acellulaires contre les virus ou les tumeurs.





**Figure 10 : Apprêtement et présentation des antigènes par les molécules de MHC**

En fonction de leur origine endogène ou exogène, les antigènes sont présentés par les APC dans des molécules de MHC I et/ou MHC II. Les peptides cytosoliques sont présentés par des molécules de MHC I et correspondent le plus souvent à des peptides endogènes. Les antigènes exogènes sont dégradés dans des voies endosomales et présentés à la surface cellulaire par des molécules de MHC II. Les cDC  $CD8^+$ , spécialisées dans la cross-présentation, peuvent charger des peptides exogènes dans des molécules de MHC I par des mécanismes divers. D'après (Villadangos, 2007)

- Maturation et migration

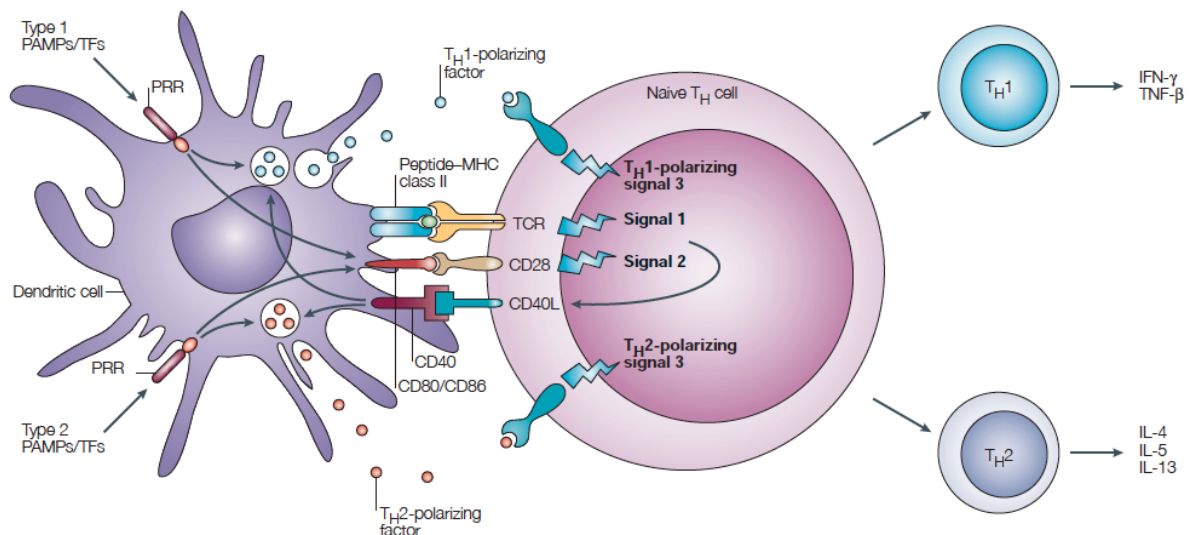
Dans les tissus périphériques, les DC sont dites immatures car leur activité immunostimulatrice est faible. Ainsi, à l'homéostasie, une fraction des DC immatures capturent les antigènes du soi provenant des tissus ou nichent ces cellules, migrent vers les ganglions drainants et présentent les antigènes du soi aux lymphocytes T, participant ainsi au processus de tolérance périphérique (Hashimoto, 2011). La notion de DC matures correspond à l'état dans lequel les DC sont les plus immunogéniques et induisent la prolifération des cellules T (Reis e Sousa, 2006). Cet état peut être induit par l'activation des DC via leurs PRR précédemment décrits ou encore via des cytokines pro-inflammatoires. Le plus souvent, mais souvent de façon abusive, la maturation est définie phénotypiquement par l'expression des molécules de co-stimulation CD40, CD80 et CD86 mais n'est pas étudiée fonctionnellement (Reis e Sousa, 2006). Le processus de maturation s'accompagne d'une diminution de la capacité de capture antigénique des DC, permettant ainsi une certaine homéostasie des complexes peptides antigéniques et MHC.

La maturation des DC s'accompagne d'une migration vers les ganglions drainants, réservoirs de lymphocytes T naifs. Cette migration repose en grande partie sur l'expression de

CCR7, récepteur des chimiokines CCL19 et CCL21, produites par les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques (Alvarez, 2008). Plus tardivement, dans les ganglions, CCR7 est également impliqué dans la rencontre avec une cellule T naïve. De plus, l'expression de CCR7 est modulée par l'environnement inflammatoire en particulier par les médiateurs lipidiques tels que la prostaglandine E2 (Randolph, 2005).

- Présentation antigénique aux cellules T

Classiquement, 3 signaux dérivés des DC matures sont nécessaires à l'activation des cellules T naïves : (i) la présentation de l'antigène (interaction du complexe MHCII-peptide immunogénique avec le TCR), (ii) les signaux de co-stimulation (interaction des molécules CD40, CD80 et CD86 avec CD28 et CD40L), (iii) la sécrétion de cytokines telles que l'IL-12p70 (Reis e Sousa, 2006). La nature de ce dernier signal est particulièrement importante quant à la différenciation de la cellule T naïve (**Figure 11**).



**Figure 11 : Modèle des 3 signaux pour la différenciation des lymphocytes CD4 auxiliaires**

Le signal 1 consiste en l'interaction MHC-TCR, et le signal 2 implique les molécules de co-stimulation. Le signal 3 influence fortement la différenciation Th1/Th2 et est sous l'influence des PRR activant la DC. D'après (Kapsenberg, 2003).

### 1.3 LES REPONSES IMMUNITAIRES ADAPTATIVES

Les fonctions de l'immunité adaptative repose sur l'activation des lymphocytes T  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  et des lymphocytes B. Son déclenchement s'effectue principalement au niveau des organes lymphoïdes secondaires, sites de rencontre privilégiés entre APC et lymphocytes naïfs.

#### 1.3.1 Lymphocytes T $CD8^+$ et réponse cytotoxique

Les réponses cytotoxiques sont nécessaires dans la lutte contre les infections intracellulaires (en particulier virales) et les processus tumoraux. Les lymphocytes T  $CD8$

reconnaissent des antigènes présentés dans le contexte du MHCI, potentiellement par toute cellule de l'organisme. L'activation des lymphocytes T CD8 aboutit à la formation de cellules effectrices cytotoxiques et à la sécrétion d'IFN- $\gamma$ , cytokine clé dans la défense contre les pathogènes intracellulaires (Yewdell, 2005). La destruction de la cellule cible par le lymphocyte CD8<sup>+</sup> est induite par la libération de granzymes et de perforine et/ou l'interaction Fas/Fas ligand. Induire une réponse CD8 demeure un enjeu majeur dans la vaccination anti-infectieuse et l'immunothérapie anti-tumorale (Foged, 2012).

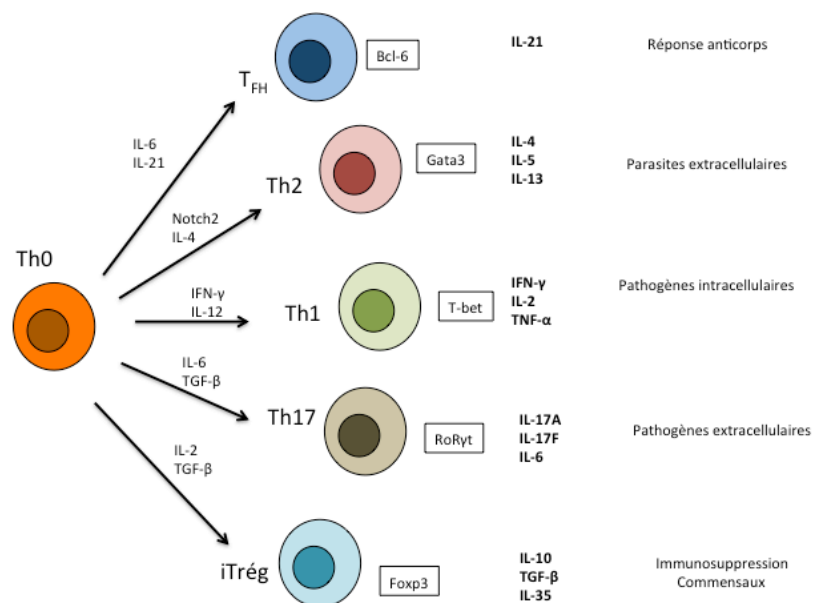
### 1.3.2 Lymphocytes T CD4 et réponse T helper

Les lymphocytes T CD4 ou lymphocytes "T helpers" ont été initialement classés en 2 catégories sur la base de la production de cytokines : les cellules Th1 potentialisent les réponses à médiation cellulaire, alors que les lymphocytes Th2 sont essentiels au développement des réponses en anticorps (Mosmann, 1986) (**Figure 12**). Les lymphocytes Th1 sont impliqués dans les réponses contre les pathogènes intracellulaires et les antigènes tumoraux. La polarisation Th1 est favorisée par l'IL-12p70 produite par les DC (**Figures 11 et 12**). A l'état différencié, les lymphocytes Th1 produisent de l'IFN- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$ . L'IFN- $\gamma$  est un activateur puissant des lymphocytes T CD8 cytotoxiques, des cellules NK et des macrophages. Les lymphocytes Th2 sont impliqués dans les réponses contre les pathogènes (parasites) extracellulaires mais aussi dans les processus allergiques, et sont caractérisés par la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13. Ces réponses Th1 et Th2 se développent de façon concurrentielle puisque les cytokines produites par les lymphocytes Th1 inhibent la différenciation Th2 et vice versa. Longtemps, la différenciation Th2 a été considérée comme une voie de polarisation par défaut, seulement due au manque d'IL-12p70. Désormais il est clair que cette réponse est activée par l'IL-4, les ligands de Notch et OX40L (Arestides, 2002; Radtke, 2013; Ziegler, 2010).

Les réponses immunitaires pouvant s'avérer délétères, elles sont contrôlées par une population de lymphocytes T, appelé T régulateur (Treg). Certains Treg (appelés Treg induits ou iTreg) se développent à partir de lymphocytes Th0, et agissent en produisant de l'IL-10, du TGF- $\beta$  et de l'IL-35 (cytokines anti-inflammatoires) au niveau des sites d'inflammation (Weaver, 2006). Ils agissent également directement en anergisant les effecteurs T et en limitant l'activation des DC. En clinique, bien que l'isolation et l'expansion *in vitro* de ces cellules représente un challenge, leur utilisation dans des contextes de greffe (GVDH par exemple) ou de maladie de Crohn réfractaire s'avère prometteuse (Desreumaux, 2012; Safinia, 2013).

Plus récemment de nouvelles sous-populations de lymphocytes Th ont été découvertes. Aggarwal *et al.* ont décrit des cellules Th produisant de l'IL-17 et différenciées sous l'influence d'IL-23 : les Th17 (Aggarwal, 2003) (**Figure 12**). Par la suite l'IL-6 et le TGF- $\beta$  ont également été démontré comme supportant cette différenciation. De façon

intéressante, de nombreux pathogènes ciblant les muqueuses (bactéries Gram+ et Gram-, champignons...) induisent des réponses Th17 et leur clairance nécessite une inflammation massive (Korn, 2009). La forte inflammation associée aux cellules Th17 peut également expliquer leur association fréquente à des pathologies auto-immunes telles que l'arthrite rhumatoïde, la sclérose multiple ou les maladies inflammatoires de l'intestin. En effet les cytokines de la famille de l'IL-17 (IL-17A et IL-17F) sont pro-inflammatoires et induisent particulièrement la production de nombreuses cytokines et chimiokines, de même que le recrutement et l'activation de neutrophiles (Korn, 2009).



**Figure 12 : Différenciation et rôle des lymphocytes CD4 dans l'immunité**

La présentation d'un antigène par une APC à un lymphocyte T CD4<sup>+</sup> naïf (Th0) induit sa prolifération et sa différenciation en lymphocyte Th1, Th2, Th17, Treg ou T<sub>FH</sub>. Les cytokines produites par l'APC influencent cette différenciation. Chaque population de lymphocyte Th exprime spécifiquement un facteur de transcription (encadré), des cytokines (**gras**) et est spécialisée dans une fonction.

Par ailleurs, Schaerli *et al.* ont caractérisé dans les amygdales une nouvelle population de lymphocytes T produisant peu d'IFN- $\gamma$  ou d'IL-13 mais capables d'augmenter significativement la production d'anticorps par les lymphocytes B (Schaerli, 2000). Ces cellules ont été définies comme « T follicular helper » ou T<sub>FH</sub>. Les lymphocytes T<sub>FH</sub> produisent l'IL-21, cytokine stimulant la prolifération des lymphocytes B et leur différenciation en plasmocytes (Crotty, 2011). Leurs fonctions bénéfiques sur la réponse en anticorps offre de nouvelles perspectives quant au développement de vaccins. Par exemple une préparation vaccinale contenant des nanoparticules et des antigènes recombinants de *Plasmodium vivax* a été montrée comme induisant une réponse humorale de forte avidité, de longue durée et de large spectre antigénique, vraisemblablement grâce à une forte induction de T<sub>FH</sub> (Moon, 2012).

La découverte des lymphocytes Th17 et T<sub>FH</sub> a bouleversé les paradigmes de la différenciation terminale des lymphocytes Th et a abouti à l'émergence du concept de plasticité (O'Shea, 2010). La transformation de cellules Treg en Th17 a été observée *in vitro* et *in vivo* lors d'infections fongiques. *In vitro*, il a également été montré que le changement d'environnement cytokinique de lymphocytes différenciés en Th17 pouvait conduire à l'acquisition d'un phénotype Th1 ou Th2 (respectivement en présence d'IL-12 et d'IL-4) (Lee, 2009). Enfin, en utilisant des souris « *Il17a* fate reporter », Hirota *et al.* ont montré que des lymphocytes Th17 de la lamina propria pouvaient se différencier en T<sub>FH</sub> et ainsi favoriser la production d'IgA (Hirota, 2013). Ce phénomène de plasticité est particulièrement intéressant en clinique, dans l'asthme par exemple, où la reprogrammation des lymphocytes Th2 en Th1 constituerait une approche thérapeutique attractive.

### 1.3.3 Réponse en anticorps

La réponse humorale ou réponse en anticorps est médiée par les lymphocytes B et peut être divisée en 2 classes en fonction de l'Ag reconnu : les réponses T-indépendantes et T-dépendantes. Ces deux réponses aboutissent à la formation d'immunoglobulines (Ig) spécifiques de l'Ag mais seule la composante T-dépendante stimule une réponse hyperspécifique de l'antigène (grâce à la maturation d'affinité) et une réponse mémoire, essentielle pour une utilisation à but vaccinal. Une réponse en anticorps T-dépendante se développe lorsqu'un lymphocyte Th et un lymphocyte B reconnaissent le même Ag et coopèrent (*i.e.* s'activent mutuellement) (Ramiscal, 2013). Contrairement aux lymphocytes T, les lymphocytes B peuvent détecter un Ag de deux façons : suite à une présentation d'Ag sous forme native ou dégradée par une DC migratoire, mais aussi suite au drainage lymphatique d'un antigène natif (généralement sous forme soluble). La coopération entre les lymphocytes Th (T<sub>FH</sub> en particulier) et B s'effectue dans les centres germinatifs des ganglions lymphatiques (ou de follicules des muqueuses voir chapitre 3). A ce niveau s'effectuent les événements d'hypermutation somatique et de commutation de classe, permettant de générer des plasmocytes sécrétant des immunoglobulines (Ig) de forte affinité pour un antigène donné (Shlomchik, 2012). Différentes classes d'Ig sont produites et se différencient principalement par la nature de la chaîne lourde : IgG, IgM, IgA, IgE et IgD et des isotypes de ces classes (par exemple IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgG3 et IgG4 pour les IgG humaines et/ou murines). En fonction de leur classe, les Ig présentent des propriétés biologiques distinctes telles que la neutralisation, l'activation du complément, l'opsonisation pour la phagocytose et la cytotoxicité dépendante des anticorps (ces 2 derniers mécanismes étant liés à la fixation des Ig sur le récepteur Fc d'une cellule hématopoïétique).

La compréhension des mécanismes mis en jeu dans l'induction mais aussi dans le maintien des réponses adaptatives T et B est essentielle en vaccinologie. En effet leur manipulation est cruciale pour l'amélioration ou la création de vaccins.

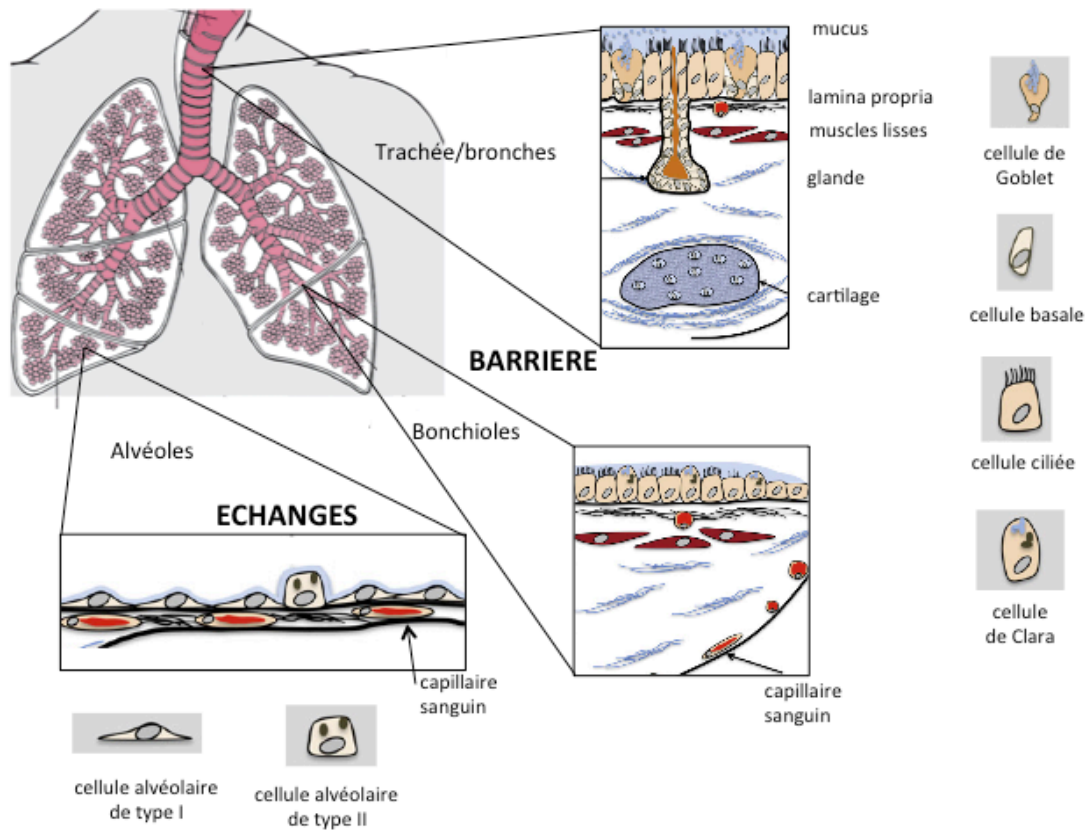
## 2 Le système immunitaire muqueux

Les muqueuses sont des tissus d'origine ectodermique ou endodermique tapissant les organes creux et cavités de l'organisme qui sont recouvertes de cellules épithéliales. Les muqueuses intestinale, pulmonaire, et génito-urinaire en raison de leur fonction physiologique présentent une surface d'échange avec l'environnement de taille importante. Puisque leur surface cumulée chez un homme adulte est estimée à 400m<sup>2</sup>, les muqueuses constituent des portes d'entrée de choix pour les microorganismes (70% des pathogènes pénètrent par ces voies) (Woodrow, 2012). Les poumons par exemple présentent une grande surface épithéliale exposée au milieu extérieur (~100 m<sup>2</sup> chez l'homme). Durant la respiration chez l'Homme, des milliers de litres d'air transitent quotidiennement dans les voies aériennes. Ainsi, le tractus respiratoire est exposé à une multitude de particules et microorganismes en suspension dans l'air. Les mécanismes de défense des muqueuses doivent donc être particulièrement efficaces afin d'éviter les infections par les microorganismes pathogènes mais également d'établir une tolérance vis à vis des germes commensaux et des antigènes environnementaux. Ce chapitre a pour but principal de décrire les mécanismes de défenses des muqueuses intestinales et pulmonaires.

### 2.1 MUQUEUSES ET IMMUNITE INNEE

#### 2.1.1 Fonctions de barrières

Les muqueuses présentent la particularité d'être compartimentées. Le compartiment externe, *i.e.* la lumière et la surface épithéliale, est à l'origine des apports environnementaux en nutriments, eau et air. Les cellules épithéliales représentent le premier type cellulaire à faire face aux micro-organismes pathogènes dans les muqueuses. Les épithéliums constituent cependant de puissantes barrières empêchant l'intrusion de pathogènes (particulièrement ceux contaminant l'environnement) dans la *lamina propria* et plus généralement dans le parenchyme des muqueuses. A l'homéostasie, leur fonction de barrière s'appuie sur 4 types de mécanismes : (1) défense mécanique grâce à la production de mucus ou aux mouvements ciliaires et péristaltiques, (2) défense biochimique grâce à la sécrétion de molécules antimicrobiennes, (3) défense phagocytaire grâce aux cellules résidentes dans le parenchyme ou présentes dans la lumière et (4) défense écologique par la flore microbienne hébergées par certaines muqueuses. Les deux premiers mécanismes sont intimement associés aux cellules épithéliales. Dans les muqueuses, les épithéliums peuvent être constitués d'une ou plusieurs couches de cellules épithéliales, organisées en épithélium monostratifié pour les muqueuses de type I ou pluristratifié pour les muqueuses de type II. Il est intéressant de constater que, dans une même muqueuse, la structure de l'épithélium varie selon la profondeur (**Figure 13**).

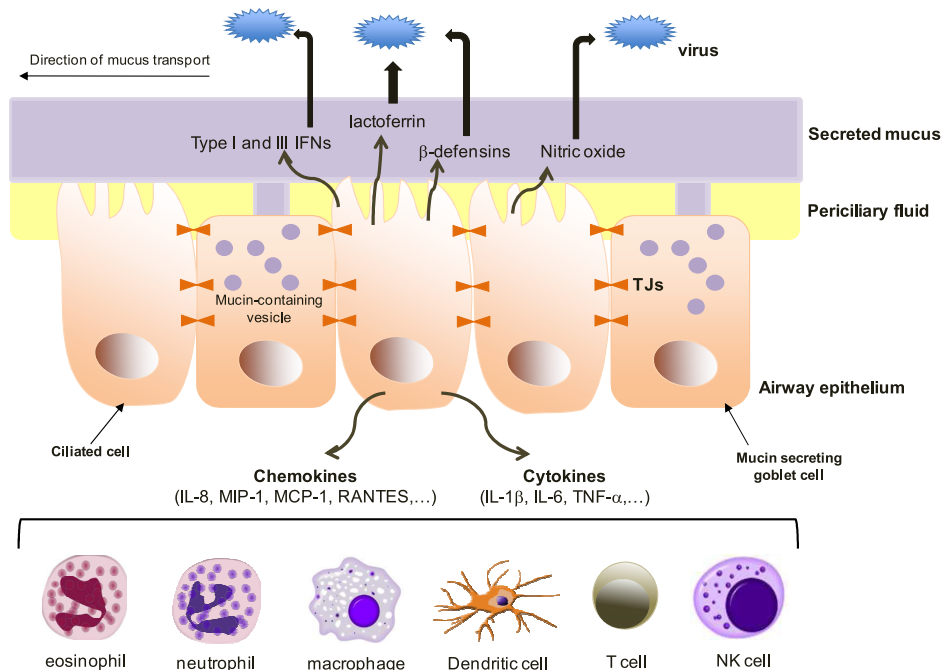


**Figure 13 : Structure des épithéliums du tractus respiratoire**

Au niveau de la trachée, l'épithélium est pseudostratifié et contient des cellules et des glandes spécialisées dans la sécrétion de mucus. Dans les bronchioles, l'épithélium devient cubique et se caractérise par la présence des cellules de Clara. Les cellules alvéolaires de type I constituent 95% de la surface des alvéoles, où la finesse de l'épithélium et la proximité des capillaires sanguins facilite les échanges gazeux. D'après (Klein, 2011)

La barrière mécanique dépend de plusieurs mécanismes. Tout d'abord, la présence de jonctions serrées entre les cellules épithéliales forme une surface quasi-imperméable aux microorganismes pathogènes et commensaux et aux particules de l'environnement (**Figure 14**). Le mucus forme un gel relativement épais (de 20 $\mu$ m dans l'intestin à 830 $\mu$ m dans le colon) qui tapisse les épithéliums des muqueuses de type I et isole les cellules épithéliales des microorganismes (Sansonetti, 2004). Dans ce but, des cellules épithéliales spécialisées (tel que les cellules de Goblet) ou des glandes associées sécrètent en permanence des vésicules de mucines, glycoprotéines constituant le mucus (**Figure 14**). Les microorganismes et les particules sont ainsi piégés dans le mucus ou en sont exclus. Dans les voies aériennes supérieures, le système muco-ciliaire permet de rejeter les microorganismes et les particules les plus larges vers le rhinopharynx puis de les expulser vers l'appareil digestif (Martin, 2005). L'importance du système de défense muco-ciliaire dans la lutte contre les infections est soulignée par la susceptibilité aux infections observée chez les patients atteints de mucoviscidose (Chaudhuri, 2008). Le mucus prévient l'interaction directe entre les cellules

épithéliales et les microorganismes pathogènes mais n'affecte pas la diffusion de macromolécules nécessaires à la fonction physiologique des muqueuses. Finalement, les cellules épithéliales sont pour la plupart renouvelées en permanence, et ce décapage cellulaire empêche l'établissement de niches microbiennes en surface.



**Figure 14 : Mécanismes de défense innée constitutive et inducible dans l'épithélium pulmonaire**

Les épithéliums constituent une barrière contre l'invasion par des microorganismes pathogènes, en particulier grâce aux jonctions serrées entre les cellules, au mouvement muco-ciliaire, et à la production de mucus, de nombreux peptides antimicrobiens et de radicaux oxydants (NO). L'épithélium est également une source importante de cytokines et de chimiokines permettant le recrutement et/ou l'activation de cellules hématopoïétiques sous-jacentes (muqueuses) ou circulantes (sanguines) tels que les phagocytes, les APC ou les lymphocytes. D'après (Vareille, 2011).

Couplée à la barrière mécanique, les muqueuses disposent d'un arsenal constitutif d'armes biochimiques pour contenir les microorganismes. Ainsi, des peptides antimicrobiens ( $\alpha$ - et  $\beta$ -défensines, cathélicidines lysozyme, lactoferrine ou lectines RegIII $\beta$ /RegIII $\gamma$ ), des opsonines (protéines du complément, pentraxin, SP-A et SP-D) ou des molécules tensio-actives ou détergentes (protéines de surfactant SP-C ou sels biliaires) sont produites en quantité massive et en permanence dans les muqueuses (Bals, 2004; Chaudhuri, 2008; Holt, 2008). Il est remarquable que le mucus permette de concentrer ces principes actifs à proximité des muqueuses établissant ainsi un gradient antimicrobien entre la lumière et les cellules épithéliales. En cas d'altération de cette barrière biochimique, les microorganismes peuvent entrer en contact avec les cellules épithéliales et provoquer une inflammation incontrôlée ou une infection disséminée (Salzman, 2003; Vaishnava, 2011).



De nombreuses cellules d'origine hématopoïétique renforcent les défenses des barrières muqueuses. En particulier, un réseau de macrophages niche dans le parenchyme ou la lumière des muqueuses. Dans le poumon, les macrophages se situent dans la lumière des alvéoles mais aussi dans le parenchyme et sont respectivement désignés macrophages alvéolaires et interstitiels. Dans le tractus intestinal ils sont présents dans la lamina propria. Les macrophages jouent un rôle primordial dans les défenses anti-infectieuses grâce à leur activité de phagocytose couplée à une activité microbicide. De plus, les macrophages participent à la clairance des cellules apoptotiques ainsi que des particules ou des pathogènes englués dans le mucus et/ou opsonisés, sans pour autant déclencher une réponse inflammatoire.

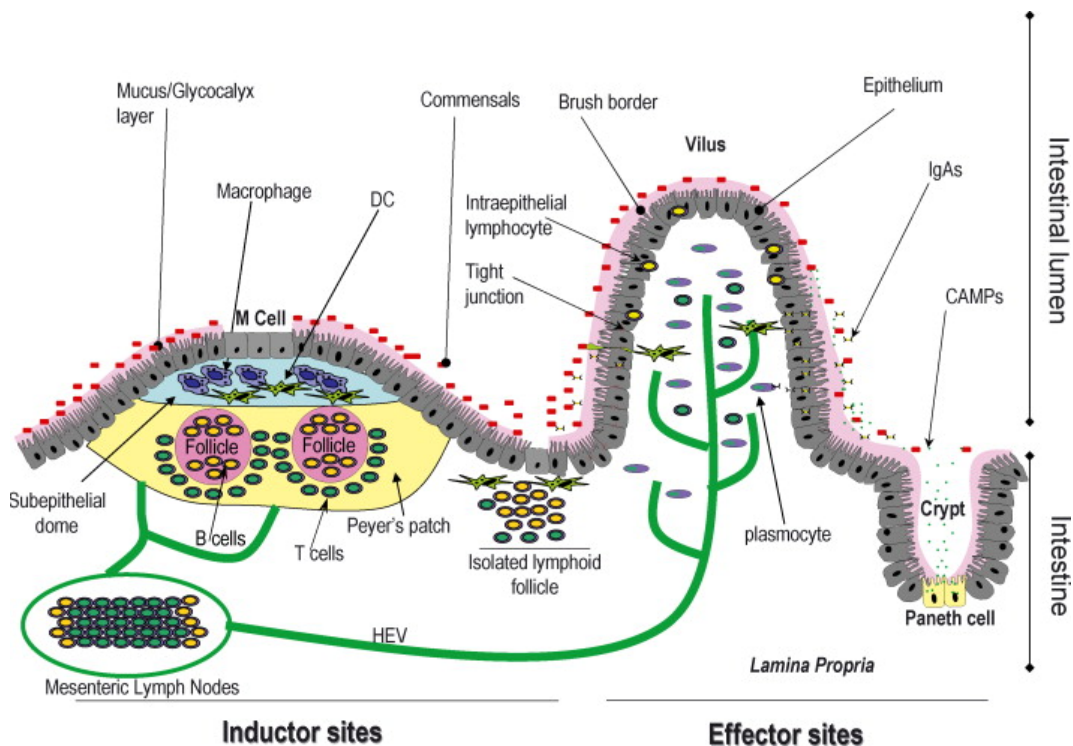
A l'état physiologique, les muqueuses peuvent héberger une flore microbienne dite commensale, ou être dépourvues de microorganismes (stériles). Ainsi, les bronches profondes et les alvéoles pulmonaires sont considérées comme des muqueuses stériles alors que la muqueuse du tractus intestinal, oral, rhinopharyngé ou trachéal est colonisée par une flore microbienne plus ou moins dense (Sansonetti, 2004). Les microorganismes commensaux sont non seulement des compétiteurs des pathogènes car ils colonisent des niches définies au sein des muqueuses et s'emparent des nutriments disponibles, mais aussi car ils sont capables de synthétiser des toxines spécifiques des pathogènes (Kamada, 2013; Sansonetti, 2004).

### **2.1.2 La défense innée inductible des muqueuses : le recrutement de cellules immunitaires**

L'immunité innée muqueuse engage deux composantes : l'une constitutive permettant une protection permanente, et la seconde inductible. L'immunité inductible repose sur la signalisation via les PRR qui provoque le recrutement et l'activation de cellules immunitaires innées dans la lumière de la muqueuse. Ces cellules néo-recrutées ont un rôle clé dans la clairance des microorganismes. Les cellules épithéliales et les macrophages résidents sont en première ligne pour intégrer et amplifier les signaux microbiens. L'étude de cellules épithéliales immortalisées de diverses muqueuses a permis de mettre en évidence une expression de l'ensemble des TLR (Abreu, 2010). Dans le poumon, les macrophages alvéolaires représentent plus de 90% des cellules intra-alvéolaires d'un individu sain. Les macrophages expriment également un large éventail de PRR et peuvent ainsi être activés par certains PAMP ou DAMP. La sécrétion de cytokines, de chimiokines et de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales et les macrophages peut ainsi être augmentée en cas d'activation des PRR (Bals, 2004). Par exemple, la production du peptide antimicrobien RegIII $\gamma$  est augmentée par la stimulation TLR dans les cellules structurales intestinales (Brandl, 2007; Cash, 2006). De même l'administration i.n. de flagelline stimule la production épithéliale de cytokines et de chimiokines de façon TLR5-dépendante. La production de chimiokines telles que CXCL1 ou CXCL5 stimule le recrutement de PMN dans le parenchyme pulmonaire puis la clairance de microorganismes (Janot, 2009; Munoz, 2010).

## 2.2 ORGANISATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE ADAPTATIF DES MUQUEUSES

Le système immunitaire muqueux est compartimenté en sites inducteurs et effecteurs. Les sites inducteurs correspondent aux sites où les lymphocytes naïfs sont activés par des CPA, et des sites effecteurs, où les cellules effectrices (lymphocytes activés) contrôlent localement les agents infectieux (**Figure 15**). Les sites inducteurs de l'immunité muqueuse sont regroupés sous le terme de tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT) (Brandtzaeg, 2008; Woodrow, 2012) et sont structurés à l'instar de ganglions lymphatiques. Dans le contexte du tractus intestinal, les plaques de Peyer et les follicules lymphoïdes isolés (ILF) constituent les principaux MALT. Les sites effecteurs sont dispersés tout au long des surfaces muqueuses et sont considérés comme diffus. Dans l'intestin ils sont distribués sur la globalité de l'épithélium de revêtement et de la *lamina propria* où se concentrent des lymphocytes T et des plasmocytes qui produisent les anticorps sécrétoires, notamment les IgA.



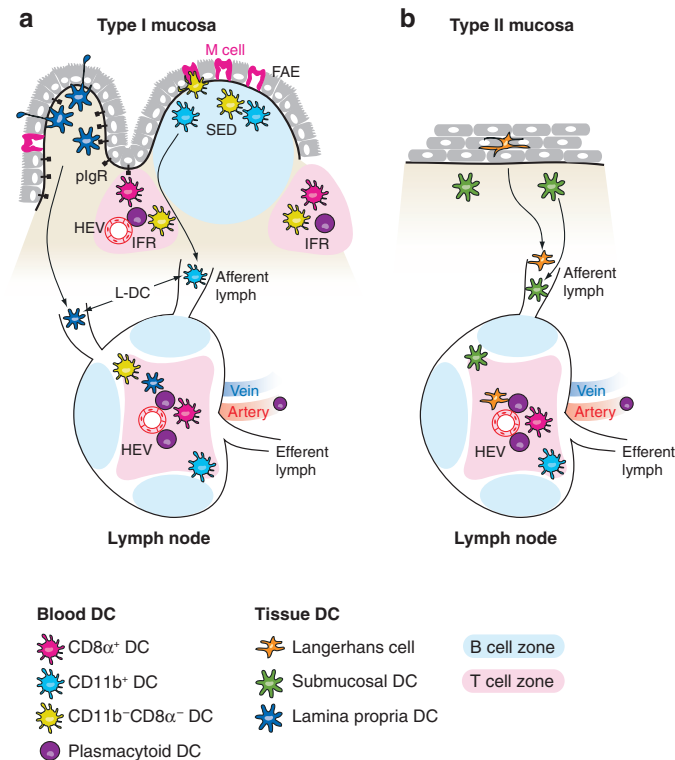
**Figure 15 : Organisation fonctionnelle des muqueuses, MALT et sites effecteurs de l'immunité adaptative de la muqueuse intestinale**

Le système immunitaire intestinal est organisé en sites inducteurs et sites effecteurs. Les sites inducteurs sont constitués de plaques de Peyer, de follicules lymphoïdes isolés et de ganglions mésentériques. Dans ces structures, les DC ayant capturé des antigènes les présentent à des lymphocytes T et B naïfs. Les lymphocytes activés migrent dans les sites effecteurs, que sont la lamina propria et l'épithélium via des veinules à haut endothélium (HEV). D'après (Magalhaes, 2007).

### 2.2.1 Induction de l'immunité muqueuse

L'organisation des sites inducteurs de l'immunité muqueuse présente des différences selon l'agencement de leur épithélium en une ou plusieurs couches (**Figure 16**). Les muqueuses de type I dont l'épithélium est monostratifié possèdent des MALT intégrés dans le tissu muqueux et pour lesquels les antigènes sont directement transférés de l'environnement vers le MALT sans passer au travers du drainage lymphatique ou des tissus lymphoïdes drainés par la muqueuse. A l'inverse, les muqueuses de type II qui possèdent un épithélium pluristratifié feront systématiquement usage des vaisseaux lymphatiques et des ganglions drainants pour stimuler une immunité adaptative effective (Iwasaki, 2007; Woodrow, 2012). Néanmoins, les muqueuses de type I ont également un système de drainage lymphatique et de ganglions associés participant à l'immunité muqueuse. Les sites inducteurs de l'intestin, de la sphère ORL et des voies respiratoires sont définis comme GALT, NALT et BALT (pour Gut-, Nasal- et Bronchial). Contrairement au rat ou au lapin, le BALT n'est pas un élément constitutif du système immunitaire de l'Homme et de la souris (Randall, 2010), Ainsi pour ces 2 dernières espèces, l'immunité est principalement dépendante du drainage des APC pulmonaires vers les ganglions médiastinaux (MdLN). Cependant, une forte réaction inflammatoire et/ou des infections respiratoires, peuvent provoquer la formation de novo de BALT ou iBALT (inducible BALT).

Dans les muqueuses de type I, les DC et les lymphocytes (T et B) colocalisent au sein de follicules lymphoïdes. L'épithélium recouvrant ces follicules est appelé FAE (follicle-associated epithelium). Il se caractérise par la présence de cellules spécialisées dans la capture antigénique appelées cellules M (Chadwick, 2010) : ces cellules de la monocouche épithéliale transfèrent les antigènes du compartiment apical vers le compartiment baso-latéral des muqueuses. Les cellules M sont présentes dans l'épithélium de l'intestin (dans les plaques de Peyer) et dans les cavités nasales (Kim, 2011). Cependant, leur existence dans les structures plus profondes des voies aériennes tel que les bronches ou les alvéoles n'a pas été formellement démontrée. Les DC sous-jacentes à l'épithélium capturent ensuite les antigènes et les transportent aux follicules lymphoïdes. La capture antigénique par les DC peut aussi opérer directement au travers de l'épithélium grâce à l'extension de dendrites entre les cellules épithéliales. Finalement, les antigènes de la lumière liés aux IgG peuvent être transférés à travers l'épithélium par l'intermédiaire du récepteur FcRn (récepteur FC néonatal) (Coombes, 2008). La présentation de l'antigène capturé par les DC aux lymphocytes Th et aux lymphocytes B s'effectue dans les follicules muqueux ou dans des sites extra-folliculaires tels que les ganglions lymphatiques (Cerutti, 2011). L'activation extra-folliculaire des lymphocytes nécessite la migration des APC muqueuses dans les ganglions drainants au travers de la lymphe. Dans les muqueuses de type II telle que la peau, seule l'activation extra-folliculaire est effective et met en jeu les cellules de Langerhans ou les DC dermales (submucosal DC) (**Figure 16**).



**Figure 16 : Différences entre les muqueuses de type I et de type II dans l'immunité adaptative**

Dans les muqueuses de type I, les DC capturent directement l'antigène dans la lumière par leurs dendrites ou dans le compartiment basal après le transport actif au travers des cellules M du FAE. La présentation antigénique peut s'effectuer in situ au niveau folliculaire (MALT) ou après migration des vaisseaux lymphatiques vers les ganglions drainants la muqueuse. Dans les muqueuses de type II, les cellules de Langerhans et DC sub-épithéliales capturent l'antigène, migrent et le présentent dans les ganglions drainants. Adapté de (Iwasaki, 2007).

Les lymphocytes T et B activés par les DC au niveau folliculaire ou ganglionnaire rejoignent ensuite les sites muqueux effecteurs par la circulation sanguine. Les événements d'hypermutation somatiques et de commutation de classe nécessaires à la production d'IgA et IgG ont également lieu dans ces follicules. La migration des lymphocytes effecteurs/mémoires vers la lamina propria dépend d'un programme d'adressage (ou homing) régulés par les APC muqueuses. Les mécanismes d'adressage seront développés dans la suite du chapitre. Enfin les lymphocytes T CD4 et CD8, mais aussi les lymphocytes B activés (plasmocytes) se localisent dans les sites effecteurs où une restimulation par des DC locales peut s'effectuer.

Les plasmocytes des muqueuses produisent des IgM, IgG mais aussi des IgA, IgD et IgE qui le plus souvent sont sécrétées dans la lumière. La proportion de ces anticorps varie selon la muqueuse, ainsi la muqueuse broncho-alvéolaire produit plus d'IgG que d'IgA ou d'IgD (Cerutti, 2011). Dans la muqueuse intestinale, les IgA sont majoritaires. Les IgA permettent d'opsoniser des microorganismes commensaux et de limiter leur distribution à la

lumière des muqueuses. Contrairement aux IgA, les IgG sont potentiellement inflammatoires, notamment par activation du complément, et sont préférentiellement produites en présence de germes pathogènes (Brandtzaeg, 2007). Dans la lamina propria les IgA sont dimériques et les IgM pentamériques. Leur passage dans la lumière de la muqueuse s'effectue par transcytose via le récepteur aux Ig polymérique (pIgR), récepteur exprimé à la face baso-latérales des cellules épithéliales. Les IgA et IgM ainsi sécrétées sont dénommées IgA et IgM sécrétoires (sIgA et sIgM) (Brandtzaeg, 2007).

### 2.2.2 Les populations d'APC respiratoires

Ce chapitre décrit les caractéristiques des APC du tractus respiratoire et met en exergue leurs spécificités ainsi que les phénotypes et fonctions communes aux APC d'autres muqueuses telles que la muqueuse intestinale ou la peau (**Tableau 5**).

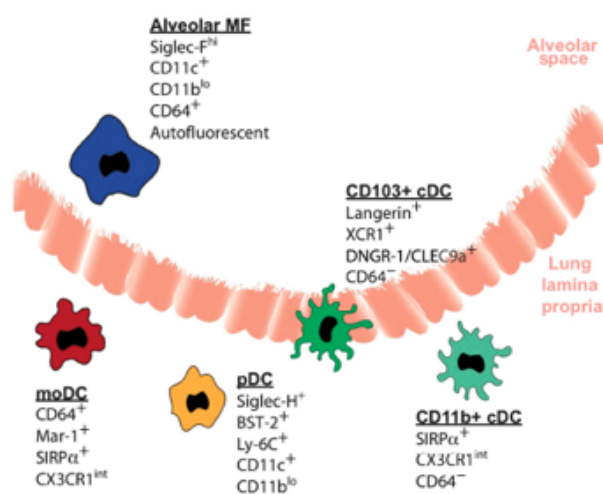
**Tableau 5 : Caractéristiques des populations d'APC dans les muqueuses**

	Intestin	Poumon	Peau
Capture Ag	cellules M + dendrites	dendrites	dendrites
cDC	CD103 <sup>+</sup> CD11b <sup>neg</sup> CD103 <sup>neg</sup> CD11b <sup>+</sup> CD103 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup>	CD103 <sup>+</sup> CD11b <sup>neg</sup> CD103 <sup>neg</sup> CD11b <sup>+</sup>	LC CD207 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD207 <sup>+</sup> CD103 <sup>+</sup> CD207 <sup>neg</sup> CD11b <sup>+</sup>
Macrophages : origine localisation	monocytes lamina propria	embryonnaire alvéoles et parenchyme	LC monocytes foetaux épiderme

Les cellules de Langerhans (LC) présentent à la fois des caractéristiques de DC et de macrophages. Dans la peau elles sont retrouvées dans l'épiderme et le derme après migration. *Ag* : *antigène*, *LC* : *cellules de Langerhans*. D'après (Coombes, 2008; Guilliams, 2010; Guilliams, 2013; Hoeffel, 2012).

Les DC du tractus pulmonaire sont renouvelées rapidement (leur demi-vie est d'environ 2 jours), et sont responsables du transport rapide des antigènes vers les ganglions drainants (Iwasaki, 2007; Lambrecht, 2012). Des DC CD103<sup>+</sup> et CD11b<sup>+</sup> sont retrouvées au niveau de l'épithélium des voies respiratoires, du parenchyme, et des alvéoles. En particulier, les DC CD103<sup>+</sup> intra-épithéliales s'immiscent dans la barrière épithéliale, y étendent des protrusions et capturent les antigènes de la lumière (Holt, 2008) (**Figure 17**). Elles expriment des protéines de jonctions serrées (claudine-1, claudine-7, et zonula occludens-2) évitant ainsi la rupture de la barrière épithéliale (Plantinga, 2010). Au contraire, les DC CD11b<sup>+</sup> sont positionnées dans la lamina propria pulmonaire mais leur capacité de capture antigénique est étonnement similaire à celle des DC CD103<sup>+</sup> (Desch, 2013). Un transfert des antigènes des DC CD103<sup>+</sup> aux DC CD11b<sup>+</sup> pourrait être à l'origine de l'efficacité de cette capture (Lambrecht, 2012). Les macrophages pulmonaires sont en première ligne pour la capture d'Ag, de particules ou de micro-organismes et leur forte capacité de phagocytose leur permet

d'éliminer les pathogènes viraux et bactériens mais également de séquestrer les antigènes, bloquant ainsi leur prise en charge par les DC (Guilliams, 2013; MacLean, 1996). Les macrophages participent au maintien de la tolérance et plus généralement à l'atténuation constante de processus inflammatoires lors d'agressions du tractus respiratoire. Globalement leur fonction est immunosuppressive (cf. chapitre 1.2) (Iwasaki, 2007). Un dernier compartiment pulmonaire est constitué par les cellules hématopoïétiques situées dans les nombreux capillaires et vaisseaux sanguins irriguant les poumons. A l'état basal, ce compartiment est composé de monocytes, PMN mais aussi de lymphocytes T et précurseurs de cDC circulants (Barletta, 2012). En cas d'inflammation, ces cellules infiltrent massivement le parenchyme pulmonaire.



**Figure 17 : Localisation et marqueurs exprimés par les APC pulmonaires**

cDC : conventional dendritic cell, DC : dendritic cell, MF : macrophage, moDC : monocyte-derived DC, pDC : plasmacytoid DC. D'après (Guilliams, 2013).

La muqueuse de l'intestin grêle héberge également des cDC (CD11b<sup>+</sup> et CD103<sup>+</sup>) et une population unique double positive CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> (**Tableau 5**). Des macrophages CX3CR1<sup>high</sup> sont également présents au sein de la lamina propria et capturent effectivement les antigènes grâce à l'extension de dendrites. Contrairement à la majorité des macrophages tissulaires qui ont une demi-vie de plusieurs années et ont la capacité de s'auto-renouveler (Hashimoto, 2013), les macrophages de la lamina propria dérivent d'un précurseur monocyttaire et ont une demi-vie courte (Persson, 2013). De plus, dans un modèle de colite, ces macrophages CX3CR1<sup>high</sup> ont la capacité de migrer dans les ganglions mésentériques et d'induire des réponses Th1 (Tamoutounour, 2012).

### 2.3 REPONSES IMMUNITAIRES MUQUEUSES A L'HOMEOSTASIE

Les réponses immunitaires muqueuses se différencient des réponses immunitaires systémiques. En effet, les muqueuses font face à des agressions permanentes et doivent

maintenir une tolérance vis à vis de germes commensaux et d'antigènes de l'environnement (aliments ou allergènes), leur régulation est donc différente de celle des compartiments systémiques de l'organisme qui sont stériles. Notamment, les réponses lymphocytaires muqueuses ont majoritairement une signature de type régulatrice (Treg en particulier), Th2 et les réponses en anticorps sont caractérisées par la présence de plasmocytes muqueux qui produisent des IgA dimériques. Cette particularité a notamment été attribuée aux différences fonctionnelles intrinsèques entre DC muqueuses et DC systémiques (Coombes, 2008).

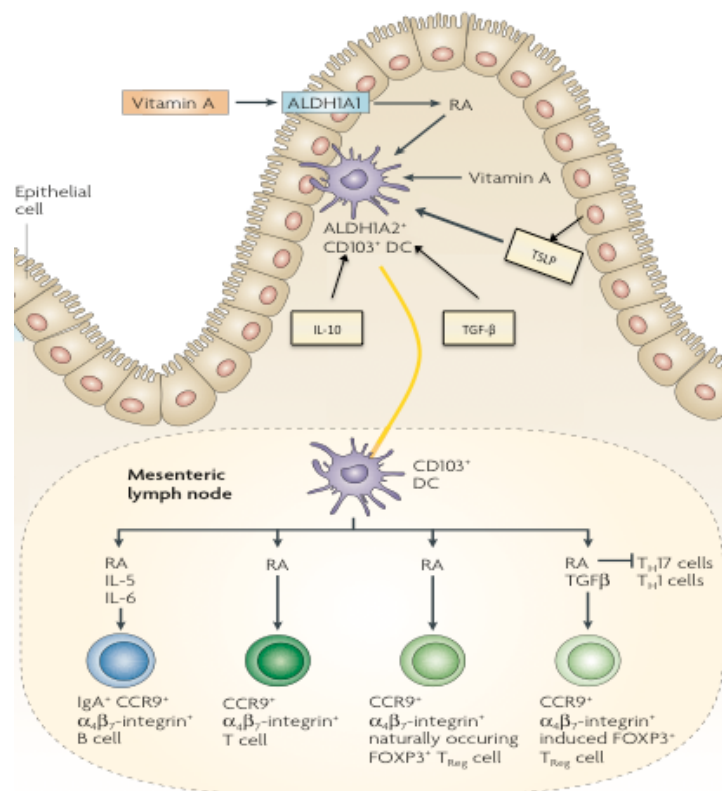
Globalement, les processus de différenciation des cellules Treg, Th2 et de plasmocytes à IgA ainsi que leur adressage, peuvent être attribués au couple épithélium/DC muqueuse. Les DC muqueuses sont comparables aux DC systémiques dans leur fonction de sentinelles mais les DC muqueuses se caractérisent par la production de cytokines favorisant la production d'IgA (notamment IL-10, IL-6, TGF- $\beta$  ou APRIL) et par l'induction préférentielle de réponses Th2 et Treg (Coombes, 2008; Iwasaki, 1999).

### 2.3.1 Influence des cytokines épithéliales sur l'homéostasie des DC muqueuses

L'épithélium met en place des conditions favorables à la différenciation et la survie des DC résidentes mais aussi d'autres cellules immunitaires telles que les lymphocytes intra-épithéliaux (IEL) (Swamy, 2010). De façon générale, le GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) favorise la survie des cDC et la différenciation terminale des populations de DC migratoires (van de Laar, 2012; Wan, 2013). Dans les muqueuses, les cellules épithéliales produisent du GM-CSF, mais son rôle précis dans l'homéostasie et dans l'activation des sous-populations de DC muqueuses (cDC CD103<sup>+</sup>, cDC CD11b<sup>+</sup> et moDC) reste controversé. Ainsi, dans le poumon, Greter *et al.* ont suggéré que la signalisation GM-CSF contrôle le développement des cDC CD11b<sup>+</sup> et CD103<sup>+</sup> à l'homéostasie (Greter, 2012), mais ces résultats ont été nuancés par Unkel *et al.* qui proposent que seule l'homéostasie des DC CD103<sup>+</sup> pulmonaire soit affectée par le GM-CSF (Unkel, 2012). Lors d'infections, la sécrétion de GM-CSF par les cellules épithéliales est augmentée (Egea, 2010; Unkel, 2012) mais l'impact sur le recrutement et la différenciation de moDC reste à préciser (Greter, 2012; Unkel, 2012).

A l'homéostasie l'environnement muqueux conditionne également les DC résidentes pour l'induction préférentielle de réponses de type Treg et Th2 (Cerutti, 2011; Coombes, 2008) (**Figure 18**). La cytokine TSLP de la famille de l'IL-7 favorise ces deux types de réponses (Ziegler, 2010). L'IL-10 et le TGF- $\beta$  participent également à l'induction de réponses Treg mais leur origine ne semble pas être épithéliale (Cerutti, 2011). Récemment, l'acide rétinoïque, produit du métabolisme de la vitamine A, a été montré comme nécessaire à l'homéostasie des cDC CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> de la lamina propria de l'intestin mais aussi à celle de leurs homologues spléniques (cDC CD11b<sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>) (Klebanoff, 2013). La synthèse d'acide

réinoïque nécessite l'action des enzymes RALDH (rétinal déshydrogénase)-1 et RALDH2, et favorise les réponses Treg, le homing des lymphocytes et la production d'IgA (**Figure 18**).



**Figure 18 : Impact de l'environnement muqueux sur le conditionnement des réponses adaptatives**

Les muqueuses, en particulier l'épithélium, conditionnent les DC à induire des réponses de type Treg et favorisant la commutation de classe vers les IgA dans les lymphocytes B. Les principaux facteurs pouvant intervenir dans ce conditionnement sont l'acide rétinoïque, le TGF-β, l'IL-10 et le TSLP. Le homing des lymphocytes activés est également favorisé par l'acide rétinoïque. Dans l'intestin les DC CD103<sup>+</sup> sont majoritairement responsables de la production d'acide rétinoïque. L'activation décrite ici s'effectue dans les ganglions drainants, mais des mécanismes similaires agissent au niveau folliculaire. D'après (Coombes, 2008).

Certaines populations de DC intestinales, pulmonaires ou de la peau possèdent la capacité unique et constitutive de métaboliser la vitamine A et la transformer en acide rétinoïque, grâce à l'expression spécifique de RALDH2 (Coombes, 2008; Williams, 2010). Chez l'adulte la RALDH1 est exprimée par des cellules épithéliales (Blomhoff, 2006; Coombes, 2008). L'induction de réponses Treg par l'acide rétinoïque peut être favorisée par la production de TGF-β, provenant par exemple des macrophages du poumon (Soroosh, 2013). Ce phénotype tolérogène des macrophages pulmonaires peut être supprimé par des agonistes TLR et des protéases comme celles présentes dans certains allergènes (Soroosh, 2013).



### 2.3.2 Les IgA : une garantie de la paix des muqueuses

Au niveau des muqueuses les sIgA permettent de confiner les germes commensaux dans le compartiment luminal et de garantir la stérilité du compartiment systémique. Les sIgA franchissent la barrière épithéliale par transcytose suite à leur interaction avec le pIgR situé à la face basolatérale des cellules épithéliales (Cerutti, 2011). La production d'IgA sécrétées peut s'effectuer de façon T-dépendante ou T-indépendante (Coombes, 2008). Classiquement il est considéré que les lymphocytes B extra-folliculaires sont stimulés de façon T-indépendante en réponse à des germes commensaux. Les IgA sécrétées sont alors de faible affinité. A l'inverse, les germes pathogènes stimulent la production d'IgA de forte affinité (et d'IgG) via l'activation T-dépendante de lymphocytes B folliculaires (Cerutti, 2011). L'induction de réponses IgA T-dépendantes nécessite l'aide des lymphocytes T<sub>FH</sub> dans les centres germinatifs mais aussi des lymphocytes Th2 et Treg.

La commutation isotypique nécessaire à la production d'IgA est induite par les cytokines BAFF (B-cell activating factor, ou TNFSF13B) et APRIL (a proliferation-inducing ligand, ou TNFSF13), constitutivement exprimées par les DC muqueuses, et nécessite l'expression de l'enzyme AID (activation-induced cytidine deaminase) au sein des lymphocytes B (Cerutti, 2011). De même, les cytokines produites par les lymphocytes Th2 et Treg (par exemple l'IL-4, l'IL-5 ou le TGF- $\beta$ ) favorisent la commutation de classe vers les IgA (Cerutti, 2011). Enfin, la présence d'IgA nécessite la production d'acide rétinoïque par les DC puisque des carences en vitamine A ont été associées à un défaut d'IgA circulantes (Coombes, 2008) (**Figure 18**). *In vitro*, les DC pulmonaires CD11b<sup>+</sup> semblent supérieures aux DC CD103<sup>+</sup> dans l'induction d'IgA (Suzuki, 2012), cette spécificité semble dépendante de la production d'IL-6 et d'IL-10 mais indépendante de leur expression de BAFF ou de RALDH (Suzuki, 2012).

L'épithélium est impliqué dans la régulation des réponses IgA T-indépendantes. Ainsi l'activation TLR de cellules épithéliales intestinales stimule la production de APRIL, BAFF et d'IL-10, cytokines impliquées dans la commutation de classe vers les IgA (Cerutti, 2011; He, 2007). La production de APRIL, BAFF et IL-10 induite par les cellules épithéliales peut aussi être indirecte : l'épithélium activé produit du TSLP, activant les DC à libérer APRIL.

### 2.3.3 Adressage muqueux des lymphocytes

Une fois activés, les lymphocytes T (CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>) et B effecteurs se relocalisent au site d'induction de réponse, dans la lamina propria : ce phénomène est appelé adressage ou "homing". De plus, les lymphocytes T activés (et mémoires) peuvent se domicilier dans une muqueuse différente de la muqueuse d'induction. Ce concept de "système immunitaire muqueux commun" introduit en 1978 par Bienenstock présente un intérêt pour le développement de vaccins muqueux (Iwasaki, 2007). L'expression spécifique de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  et du récepteur aux chimiokines CCR9 par les lymphocytes effecteurs/mémoires permet

leur adressage dans la muqueuse intestinale. Cet adressage est rendu possible par l'expression constitutive de MadCam (mucosal vascular addressin cell adhesion molecule)-1 et CCL25 (ligands respectifs de  $\alpha 4\beta 7$  et CCR9) par l'endothélium et l'épithélium intestinal (Agace, 2008). L'induction de l'expression de CCR9 et  $\alpha 4\beta 7$  sur les lymphocytes T et B activés est contrôlée par les DC elles-mêmes (en particulier les cDC CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) grâce à leur production d'acide rétinoïque (Brandtzaeg, 2009; Coombes, 2008; Guilliams, 2010) (**Figure 18**). Au niveau de la muqueuse pulmonaire l'induction de CCR4 est décisive pour la relocalisation des effecteurs T dans le poumon (Mikhak, 2013). De même conformément au concept de muqueuse unifiée, l'induction de CCR9 suivie d'une relocalisation intestinale a également été rapportée, in vitro et in vivo, suite à une immunisation pulmonaire (Ruane, 2013).

Le homing dans l'épiderme est influencé par des DC locales stimulant l'expression de ligands de selectines (P- et E-sélectine) et de CCR10 par les lymphocytes T. Il est notable que les DC dermiques CD103<sup>neg</sup> (mais aussi pulmonaires CD11b<sup>+</sup> et CD103<sup>+</sup>) sont également capables de métaboliser la vitamine A. Dans ce cas, l'induction de CCR9 sur les lymphocytes T activés doit être contre-balançée par d'autres signaux (Guilliams, 2010). Pour les DC dermiques c'est la métabolisation de la vitamine D3 qui permet la réduction de l'expression de CCR9 au profit de CCR10 sur les lymphocytes T activés (Sigmundsdottir, 2007). Ces lymphocytes se relocalisent donc préférentiellement dans l'épiderme, producteur du ligand de CCR10 : la chimiokine CCL27.

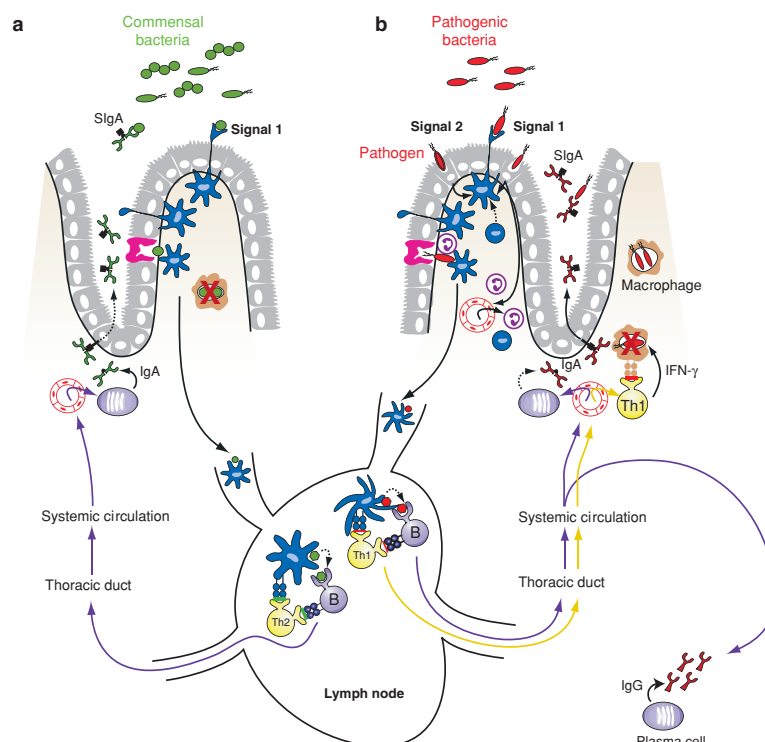
Les chimiokines produites par le tissu inflammatoire inducteur ont un rôle majeur dans la relocalisation spécifique des lymphocytes T activés. Il est donc envisageable que ces chimiokines influencent la nature de la réponse T déclenchée. Par exemple les lymphocytes différenciés en Th17 exprimant CCR6, la production de CCL20 par la muqueuse peut influencer leur homing. Il est notable que CCL20 est exprimé de façon constitutive par l'épithélium intestinal, au niveau FAE présents dans les sites inducteurs (Sirard, 2009).

#### 2.4 REPONSES ADAPTATIVES MUQUEUSES EN CONDITIONS PATHOLOGIQUES

A l'homéostasie, les muqueuses représentent donc une zone d'immunosuppression où l'inflammation en réponse aux commensaux et antigènes de l'environnement est prédominante. L'importance de cette régulation est soulignée dans le cas de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin où les réponses de type Th1 se développent en absence de danger. Cependant il est possible qu'un danger réel, tel qu'un pathogène se présente dans la muqueuse. Dans ce cas les réponses de type inflammatoires sont nécessaires afin d'éviter la pénétration du pathogène dans le compartiment systémique.

### 2.4.1 Recrutement des phagocytes

Dans les cas d'infections ou de vaccination, il a été proposé que l'inflammation permette le recrutement de DC dérivant de précurseurs circulants (en particulier moDC) et échappant donc au conditionnement muqueux (Coombes, 2008; Iwasaki, 2007) (**Figure 19**). Ainsi en cas d'invasion et d'infection de l'épithélium par un pathogène, des cytokines pro-inflammatoires sont sécrétées et stimulent efficacement les DC ayant capturé les pathogènes. De plus, les cytokines pro-inflammatoires produites par les cellules épithéliales permettent le recrutement et la différenciation de monocytes en moDC. Contrairement aux cDC résidentes conditionnées, les moDC néo-recrutées sont très efficaces dans l'induction de réponses de type Th1. Un tel processus pourrait expliquer que de faibles doses de LPS induisent des réponses de type Th2, tandis que de fortes doses induisent des réponses Th1 (Tan, 2010).



**Figure 19 : Recrutement de moDC et induction de réponses Th1 muqueuses**

D'après (Iwasaki, 2007).

### 2.4.2 Activation épithéliale en condition pathologique et maturation fonctionnelle des APC

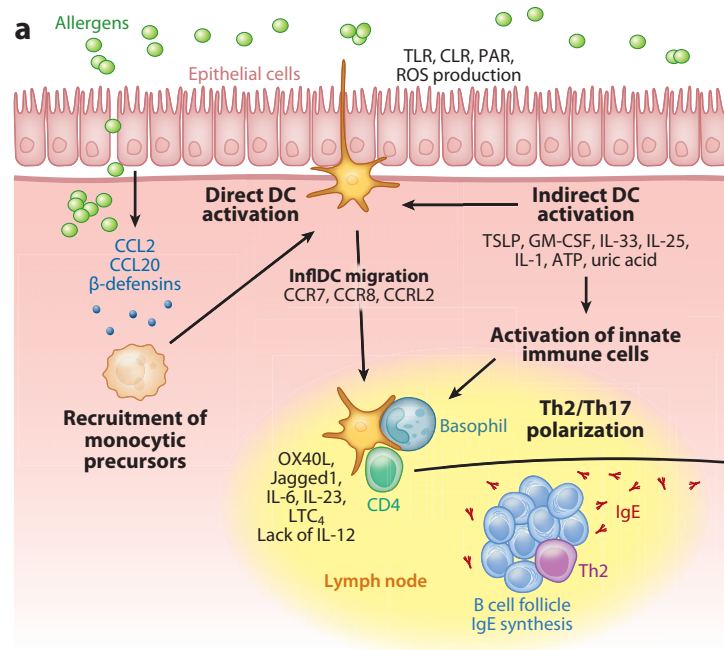
Dans le compartiment systémique, en réponse à un agoniste TLR, l'activation des DC par des médiateurs inflammatoires (ou transactivation) ne suffit pas à activer une réponse CD4 (Sporri, 2005). Ainsi, les DC spléniques *Tlr4*<sup>-/-</sup> ne sont pas fonctionnellement activées par l'injection de LPS, malgré la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le

TNF, l'IL-1 $\beta$  ou l'IL-6 produites par le stroma (Nolte, 2007). Cependant, ce concept ne semble pas se vérifier par voie muqueuse où l'activation fonctionnelle des DC par des cytokines d'origine épithéliale a pu être observée dans des modèles d'asthme (Hammad, 2009), ou d'infections respiratoires virales (Pang, 2013; Rudd, 2007). De façon non exhaustive, les principales cytokines potentiellement responsables de cette transactivation sont décrites ci-dessous.

En clinique, le taux de TSLP a été corrélé à la survenue d'allergies tels que l'asthme, la rhinite ou la dermatite atopique (Hammad, 2008; Lambrecht, 2012) (**Figure 20**). La production de TSLP par des cellules épithéliales respiratoires ou intestinales, ou par les kératinocytes peut être induite suite à une stimulation TLR (Hammad, 2009; Xie, 2012) (Ziegler, 2010). La signalisation via le récepteur au TSLP (TSLPR) provoque la maturation des DC associée à une faible production d'IL-12, induisant ainsi des réponses de type Th2 ou Treg (Swamy, 2010). La réponse Th2 générée se caractérise par l'absence d'IL-10 au profit du TNF- $\alpha$ . Cette réponse, appelée « Th2 inflammatoire » est attribuée à la surexpression de OX40L par les DC stimulées avec le TSLP (Liu, 2007).

Le GM-CSF participe aussi à l'étiologie de l'asthme allergique en hyperstimulant les DC (Hammad, 2008) (**Figure 20**). Le GM-CSF est fortement pro-inflammatoire et sa neutralisation dans des modèles d'inflammation pulmonaire (asthme, BPCO, inflammation induite par le LPS) réduit la sévérité de la pathologie (Hamilton, 2008). *In vitro* contrairement aux DC différenciées par le ligand de Flt3, les DC différenciées par le GM-CSF présentent un phénotype inflammatoire (**Tableau 4**). Enfin, la signalisation GM-CSF dans les DC active la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B, stimulant la production de cytokines pro-inflammatoires et l'expression de molécules de co-stimulation (van de Laar, 2012)

L'IL-25 et l'IL-33 appartiennent respectivement aux familles de l'IL-17 et de l'IL-1, et sont également impliquées dans l'asthme (**Figure 20**). Tout comme le TSLP, et le GM-CSF ces cytokines induisent des réponses de type Th2 inflammatoires mais leur fonction d'activation des DC n'a pas été clairement démontrée. Cependant, dans l'immunité innée liée à l'asthme, ils activent les mastocytes et les éosinophiles (Saenz, 2008).



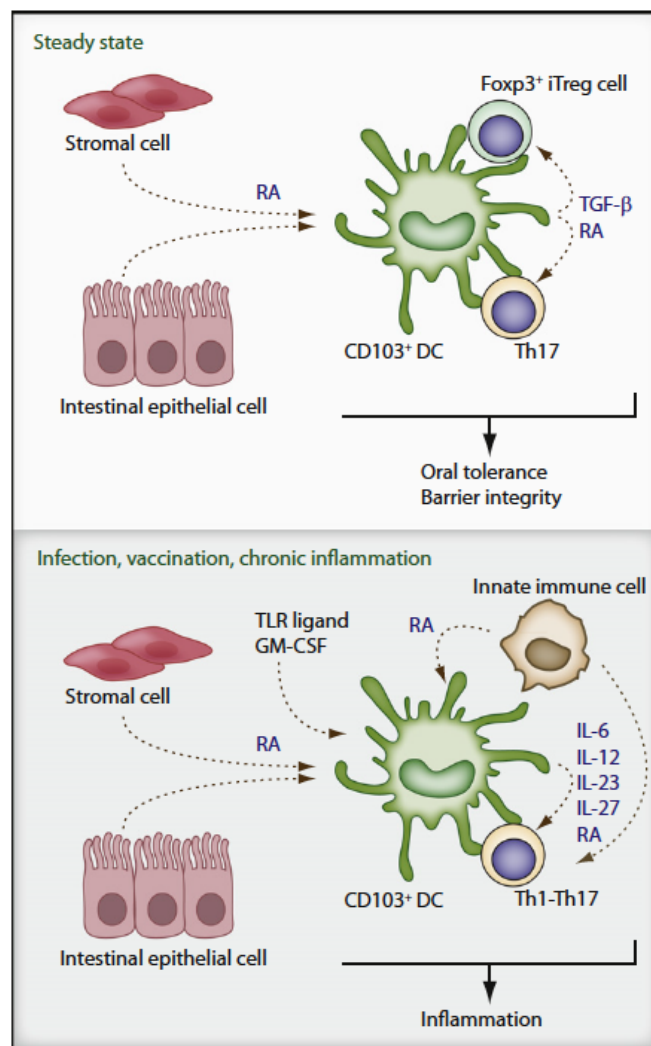
**Figure 20 : Cytokines épithéliales et maturation des DC dans l'asthme allergique**

Dans la muqueuse pulmonaire, les allergènes activent des PRR épithéliaux. En réponse, l'épithélium produit des chimiokines attirant des DC immatures, de même que des cytokines stimulant leur maturation et leur migration dans les ganglions médiastinaux. Dans ce modèle les facteurs épithéliaux activant les DC sont multiples. L'activation de la réponse T par ces DC s'accompagne d'une différenciation Th2/Th17.

Les cytokines de la famille de l'IL-1 peuvent activer les DC muqueuses de façon directe ou indirecte. Ces cytokines telles que l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-33 signalent via l'IL1R1 et utilisent l'adaptateur MyD88 (Arend, 2008). Dans un modèle d'asthme allergique, la signalisation TLR4 épithéliale induit la production d'IL-1 $\alpha$  (Willart, 2012). Par la suite l'action autocrine de l'IL-1 $\alpha$  contrôle la production des médiateurs Th2, GM-CSF et IL-33, précédemment décrits. Dans un modèle d'infection grippale, la signalisation dépendante de l'IL-1 $\beta$  sur les DC pulmonaires est nécessaire à la survie, la maturation et la migration cellulaire (Pang, 2013). Les DC ainsi stimulées sont capables par la suite d'induire une réponse CD8. Dans ce modèle, la production d'IL-1 $\beta$  nécessite l'activation de l'inflammasome au niveau du compartiment stromal (Pang, 2013). Enfin les cytokines IL-1F6, IL-1F8 et IL-1F9 sont d'origine épithéliale et sont de puissants activateurs des DC et des lymphocytes T *in vitro* et *in vivo* (Gresnigt, 2013 ; Swamy, 2010; Vigne, 2011; Vigne, 2012). Toutes ces cytokines dérivées de l'IL-1 induisent majoritairement des réponses de type Th1 et Th17 et seraient essentielles à l'immunité adaptative anti-infectieuse. Enfin la stimulation de cellules épithéliales par des agonistes TLR stimule l'expression de la chimiokine CCL20, impliquée dans le recrutement d'APC immatures.

### 2.4.3 Réponses Th17 et Th1

Lors d'infections ou d'inflammation stérile, l'influence régulatrice du TGF- $\beta$  et de l'acide rétinoïque peut être levée, et des réponses inflammatoires de type Th17 mais aussi Th1 peuvent alors être stimulées. La transition d'une réponse Treg à Th17 est favorisée par la production de cytokines pro-inflammatoires, entre autres d'IL-6, par les DC et/ou la diminution de la concentration d'acide rétinoïque (**Figure 21**). *In vivo* la production d'IL-6 peut être stimulée par une activation TLR et MyD88 (Persson, 2013). Ainsi de faibles concentrations d'acide rétinoïque favorisent la différenciation Th17 et le homing des lymphocytes, tandis que de fortes concentrations favorisent la différenciation et le homing des Treg (Agace, 2008).



**Figure 21 : Modulation du conditionnement muqueux des DC et de la réponse adaptative par des signaux inflammatoires**

A l'homéostasie, les DC sont conditionnés par des médiateurs épithéliaux tel l'acide rétinoïque ce qui induit la différenciation de lymphocytes Treg dans les muqueuses. En revanche, en situation inflammatoire (infection, vaccination ou inflammation chronique), les DC intègrent les signaux de danger (via les PRR) et produisent alors des cytokines pro-inflammatoires ce qui favorise une différenciation Th1 et Th17 de la réponse cellulaire. Ainsi, les muqueuses développent une réponse adaptée pour revenir à l'homéostasie. D'après (Hall, 2011)

De façon intéressante, l'immunisation intranasale a été associée à une réponse préférentielle Th17 (Zygmunt, 2009). Ainsi des agonistes TLR (BPPcysPEG, CpG) associés à des réponses Th1 ou Th2 par voie systémique, stimulent les réponses Th17 par voie intranasale. Cette réponse Th17 a été montrée comme due à une forte production d'IL-6 par les DC muqueuses (du NALT) comparativement à des DC systémiques. Bien que la nature des DC migratoires induisant cette réponse T n'ait pas été analysée, l'implication des cDC CD11b<sup>+</sup> y est fort probable.

Enfin les cDC CD11b<sup>+</sup> pulmonaires et CD11b<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> intestinales semblent programmées pour induire des réponses de type Th17 (Persson, 2013; Schlitzer, 2013). A l'état basal elles expriment fortement des cytokines favorisant les réponses Th17 telles que l'IL-6 ou l'IL-23 (au niveau transcriptionnel). Ces 2 populations de DC muqueuses dépendent du facteur de transcription IRF4 pour leur maintien et leur migration contrairement aux DC spléniques. Cependant il est remarquable que, lors d'infections pulmonaires, seule la composante Th17 de la réponse est affectée par la déficience d'IRF4 (Schlitzer, 2013).

#### 2.4.4 Réponse IgG et IgA contre les pathogènes

Si les réponses IgA contre les commensaux sont majoritairement T-indépendantes, les réponses IgA et IgG contre les pathogènes nécessitent l'aide des lymphocytes Th (en particulier T<sub>FH</sub>) (Cerutti, 2011; Macpherson, 2008; Nolte, 2007). Dans les centres germinatifs des follicules et des ganglions drainants des muqueuses opèrent la maturation d'affinité des Ig et leur commutation de classe. Dans ce cas les interactions CD40-CD40L stimulent l'expression de AID (Cerutti, 2011).

L'induction des IgG et IgA sériques est d'importance pour l'immunité du parenchyme pulmonaire (Brandtzaeg, 2007). Ainsi lors d'infections grippales, les IgG protègent le parenchyme tandis que les IgA protègent les conduits respiratoires (Macpherson, 2008). En plus de l'aide fournie par les lymphocytes T pour la commutation de classe et la maturation d'affinité des IgA, les lymphocytes T peuvent aider la sécrétion de IgA. Comme précédemment mentionné, la transcytose des IgA sécrétoires est dépendante de pIgR. L'expression des pIgR peut être induite par des cytokines telles que l'IFN- $\gamma$  et l'IL-4 ou encore le TNF et l'IL-1. Au niveau pulmonaire, l'expression du pIgR par les cellules épithéliales et la quantité de sIgA dans le BAL, ont été associés à la présence de lymphocytes de type Th17 et d'IL-17 (Jaffar, 2009). Dans la muqueuse intestinale, les lymphocytes Th17 ont également été associés à la production d'IgA suite à leur transdifférenciation en lymphocytes T<sub>FH</sub> (Hirota, 2013).

Des observations *in vivo* confortent un rôle de la stimulation TLR dans le reconditionnement fonctionnel des APC muqueuses. Ainsi, les DC CD11b<sup>+</sup> de la lamina propria de l'intestin répondent spécifiquement à la stimulation TLR5 en favorisant la différenciation de lymphocytes B naïfs en plasmocytes sécréteurs d'IgA de façon T-

indépendante (Uematsu, 2008). Les DC stimulées par TLR5 produisent l'IL-6 et l'acide rétinoïque et stimulent la différenciation Th17 favorable à la réponse IgA. Les stimulations TLR peuvent également à l'origine de la génération muqueuse de TipDC, stimulant par la suite la production d'IgA de façon T-dépendante et T-indépendante (Tezuka, 2007).

Ainsi les cDC résidentes des muqueuses semblent pouvoir échapper au conditionnement régulateur de l'épithélium et stimuler des réponses variables en fonction de leur environnement. L'étude des mécanismes régulant la plasticité des DC et des lymphocytes T, représente un intérêt majeur pour la vaccination muqueuse.



### 3 Vaccins et adjuvants

#### 3.1 SUCCES DE LA VACCINATION ET DEFIS FUTURS

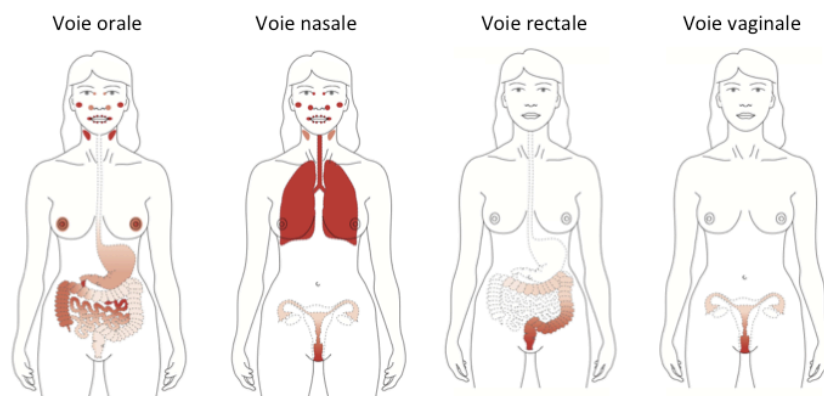
En Europe, les premières expériences de vaccination furent menées par Edward Jenner dès 1796. Ses expériences sont basées sur le fait que les personnes atteintes de la variole bovine (ou vaccine), maladie bénigne transmise par les vaches, étaient protégées de la redoutable infection qu'est la variole. La systématisation de ce concept a mené 200 ans plus tard à l'éradication de cette pathologie (Andre, 2003). Les travaux de Pasteur ont ensuite permis de démontrer que l'atténuation de microorganismes pathogènes pouvait être utilisée de façon rationnelle pour la création de souches vaccinales (Plotkin, 2005). L'éradication de pathogènes par la vaccination repose sur le principe de l'immunité de masse (*herd immunity*), principe selon lequel l'immunisation de groupe protège les individus non immunisés (Stern, 2005). Ainsi des campagnes de vaccination particulièrement efficaces ont permis l'éradication de la variole et de la poliomyélite ainsi qu'une diminution de plus de 95% de l'incidence de la diphtérie ou du tétanos (Rappuoli, 2011). Malgré ces succès et une efficacité incontestable, la vaccination fait depuis quelques années l'objet de polémiques. Par exemple en France, la campagne massive de vaccination contre l'hépatite B chez les adolescents a dû être stoppée car le vaccin était soupçonné de favoriser la survenue de la sclérose en plaque. De même, le vaccin pandémique H1N1 a été associée à l'apparition anormalement fréquente de narcolepsies (Dauvilliers, 2013). Enfin l'alum, adjuvant de nombreux vaccins, est suspecté d'induire une myopathie appelée la myofasciite à macrophages. Ces craintes et polémiques se diffusent facilement sur internet, où les réseaux sociaux sont devenus la principale source d'information médicale de nombreux patients. Les vaccins se doivent d'être des produits de santé d'autant plus sûrs qu'ils sont administrés à des individus sains et le plus souvent à des nouveaux nés ou des enfants. Cette nouvelle perception sociétale est un facteur essentiel à considérer dans la vaccination, des étapes de recherche aux campagnes de sensibilisation.

Dans ce cadre, les laboratoires de recherche s'interrogent sur le fonctionnement des vaccins. En effet, le mode d'action des vaccins, et en particulier des adjuvants, reste en grande partie incompris. De plus, une nouvelle phase dans la vaccinologie moderne est cruciale pour relever les défis du 21ème siècle que sont (i) le développement de vaccins contre la malaria, le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) et la tuberculose, (ii) l'émergence de vaccins thérapeutiques contre les cancers, les maladies inflammatoires chroniques ou les affections dégénératives et (iii) la capacité à mettre en place une stratégie de vaccination dans de futures pandémies. Enfin les vaccins existants (par exemple les vaccins contre la tuberculose, la coqueluche ou les rotavirus) pourront être améliorés en terme d'efficacité mais aussi de stabilité ou de coût (Amorij, 2012). Cette vaccinologie moderne se veut être une science de l'exploration fonctionnelle et de la biologie intégrative via des approches multiparamétriques telle que la "Systems vaccinology".

### 3.2 VACCINS SYSTEMIQUES ET MUQUEUX

Aujourd'hui la majorité des vaccins est administrée par voie intramusculaire. Cependant, bien que très efficace, cette voie de vaccination présente certaines limitations : elle est invasive, l'injection doit être effectuée par un personnel qualifié, et elle n'est pas adaptée pour l'induction d'une immunité muqueuse (Amorij, 2012), qui est la composante essentielle de l'immunité spécifique de nombreux pathogènes. Différentes voies d'administration ont été envisagées pour les vaccins muqueux telles que les voies orale, intranasale, sublinguale ou génitale, mais la voie orale reste l'approche majoritaire du développement vaccinal. Les vaccins muqueux commercialisés (par voie orale mais aussi intranasale) sont principalement des vaccins vivants atténués (Lycke, 2012) et non adjuvés (à l'exception de Dukoral, constitué de *Vibrio cholerae* tué et de la sous-unité B de la toxine cholérique).

L'immunité induite par les vaccins muqueux se caractérise par la production d'anticorps circulants et d'anticorps dans les sécrétions muqueuses (IgG et sIgA), ainsi que de réponses T (à dominance Th2 et régulatrice) dans les compartiments muqueux et systémiques (Lycke, 2012). De plus, le système immunitaire muqueux présente des mécanismes d'induction et de domiciliation de l'immunité tels, que des réponses protectrices peuvent être stimulées dans des muqueuses éloignées de la muqueuse vaccinée (**Figure 22**).



**Figure 22 : Le système immunitaire muqueux commun: des réponses effectrices au delà de la muqueuse vaccinée**

La voie d'administration d'un vaccin muqueux stimule non seulement une immunité spécifique au site d'induction mais également une immunité dans des muqueuses distantes (représentées en rouge). Par exemple, la voie nasale stimule des anticorps sécrétoires dans le tractus respiratoire et le tractus génital. D'après (Holmgren, 2012).

Les vaccins oraux contre des pathologies telles que la poliomyélite ou le choléra se sont montrés plus efficaces que les vaccins systémiques, en particulier grâce à leur capacité unique à induire des réponses sIgA protectrices dans la muqueuse intestinale, et éteindre les

infections au stade le plus précoce. Concernant la muqueuse respiratoire, la majorité des vaccins anti-grippaux sont administrés par voie i.m. et stimulent la production d'IgG systémiques pouvant transuder et protéger les voies respiratoires inférieures. A l'inverse le vaccin intranasal Flumist® induit des sIgA et des réponses cellulaires dans les voies aériennes supérieures, protégeant de l'infection (Holmgren, 2012). De même, les vaccins Cervarix™ et Gardasil® (ciblant les cancer du col de l'utérus dus aux papillomavirus) administrés par voie i.m. induisent des IgG dans la muqueuse vaginale provenant vraisemblablement de la transudation d'IgG systémiques (Draper, 2013). Contrairement à la muqueuse respiratoire, la muqueuse digestive est peu perméable et empêche la transudation d'anticorps sériques (Holmgren, 2012).

### 3.3 POURQUOI UTILISER DES ADJUVANTS ?

La majorité des vaccins commerciaux sont constitués de pathogènes entiers tués (vaccins inactivés) ou vivants (vaccins atténués) (**Tableau 6**) (Unnikrishnan, 2012).

**Tableau 6 : Principaux vaccins en France en 2013 dans la population générale ou certaines populations à risque**

Cible	Type de vaccin	Exemples	Adjuvant
Diphtérie Tétanos Polio	anatoxines virus entier inactivé	nombreuses associations	alum
Rougeole Oreillons Rubéole	virus vivants atténués	Prorix® Rouvax®	/
Coqueluche acellulaire	protéique	nombreuses associations (vaccins pentavalents et hexavalents)	alum
<i>Haemophilus influenzae b</i>	polysaccharide de surface	nombreuses associations (vaccins pentavalents et hexavalents)	alum
Grippe	virus inactivé fragmenté virus vivant atténué	Vaxigrip® (i.m.) Flumist® (i.n.)	/ /
Hépatite A	virus entier inactivé	Havrix® Avaxim®	alum alum
Hépatite B	recombinant	Engerix B® Genhevac®	alum alum
Pneumocoque	polysaccharide de capsule	Pneumo23® Prevenar13®	/ alum
Méningocoque C	polyoside	Meningitec® Neisvac®	alum
Papillomavirus	recombinant	Gardasil® Cervarix®	alum AS04
Tuberculose	BCG (vivant atténué)	BCG SSI®	/

(liste non exhaustive) i.m. : vaccin administré par voie intramusculaire, i.n. : parvoie intranasale

Il est notable que l'immunogénicité (et la protection) induite par les vaccins vivants est généralement supérieure à celle des vaccins tués. En effet, les vaccins vivants miment en plus

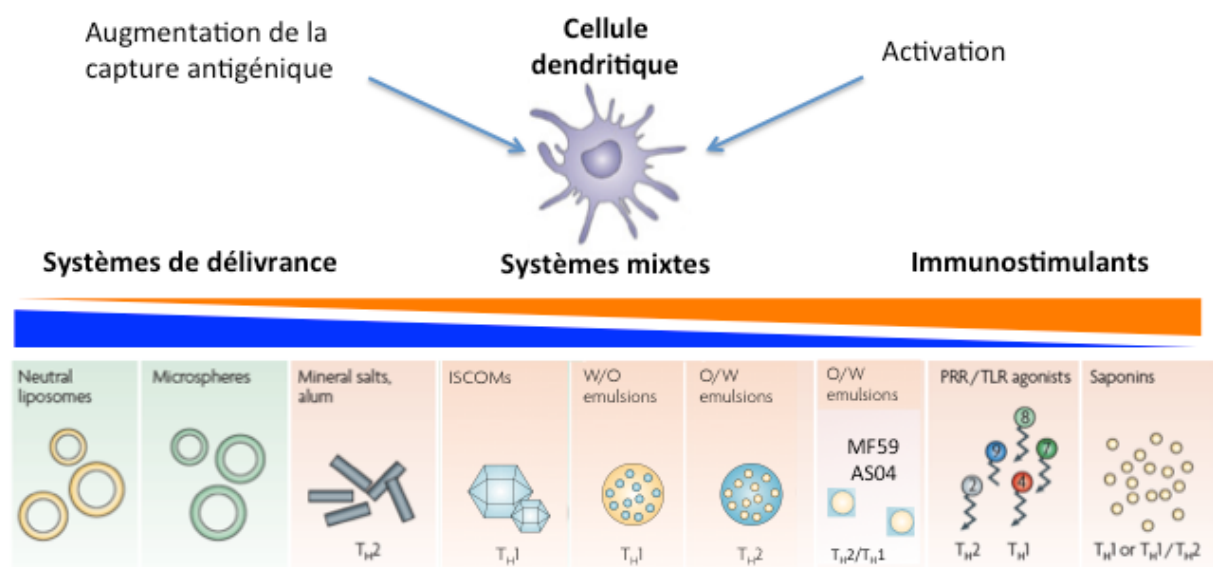
grande partie le cycle infectieux naturel du microorganisme pathogène et génèrent ainsi une immunité parfaite lors de réinfections. De plus, le danger potentiel que représente un microorganisme vivant et exprimant des PAMP spécifiques de leur activité biologique (vitaPAMP) est supérieur à celui représenté par un microorganisme mort (Blander, 2012) (**voir Chapitre 1, Figure 9**). Bien que les vaccins vivants atténués soient très efficaces, leur utilisation est contre-indiquée chez les personnes immunodéprimées ou les nouveau-nés, et pose quelquefois le problème de réversion de la virulence (Rappuoli, 2011). Ces aspects sont critiques pour la vaccination des personnes atteintes de SIDA ou sous thérapies immunosuppressives, mais également pour les populations émergentes de nos sociétés modernes telles que les personnes âgées ou les individus avec des désordres métaboliques qui présentent un système immunitaire affaibli (Rappuoli, 2011).

Les vaccins les plus récents proviennent de l'ingénierie moléculaire et sont souvent constitués d'antigènes purifiés ou recombinants qui sont mieux tolérés mais également peu enclins à induire seuls une réponse protectrice (Unnikrishnan, 2012). Dans le cas de ces vaccins sous-unitaires, l'ajout d'un adjuvant dans la formulation vaccinale permet de leurrer le système immunitaire sur la dangerosité de l'antigène rencontré et l'intensité de la réponse à y associer (Blander, 2012; Matzinger, 2002). Les APC étant les cellules clés dans l'initiation des réponses immunitaires adaptatives (chapitre 1), elles représentent des cibles privilégiées pour les adjuvants. En plus d'augmenter quantitativement la réponse spécifique des antigènes, les adjuvants vaccinaux peuvent améliorer la réponse immunitaire sur le plan qualitatif (Kasturi, 2011; Moon, 2012). Par exemple, l'addition d'agonistes TLR4 et TLR7 (MPL et R837 respectivement) à des particules de PLGA (acide poly(lactique-co-glycolique)) permet non seulement d'augmenter la quantité d'anticorps circulants mais aussi leur avidité et la persistance de l'immunité comparativement à la vaccination avec les particules seules ou contenant un seul agoniste de TLR (Kasturi, 2011). Cette stimulation de la réponse en anticorps a été corrélée à la persistance des centres germinatifs et une meilleure induction de la réponse  $T_{FH}$  en présence de la combinaison d'adjuvants (Kasturi, 2011; Moon, 2012). L'incorporation d'adjuvants à un vaccin peut également permettre de réduire la dose d'antigène nécessaire à l'obtention d'une réponse protectrice (Dormitzer, 2011). Cet aspect s'est révélé critique lors de la pandémie grippale H1N1 de 2009, où les capacités de production d'antigènes étaient limitées. Enfin, comme nous le verrons par la suite, chaque adjuvant induit une réponse préférentielle (réponse Th2, Th1/Th2 ou CTL par exemple). Ainsi le choix d'un adjuvant est dicté par le(s) corrélats de protection déterminé(s) pour chaque pathogène (Amorij, 2012; Pulendran, 2005). Pour la majorité des vaccins commerciaux, l'efficacité de protection est associée à la production d'anticorps circulants dans un mécanisme dépendant de la réponse Th. Les défis de la vaccination future sont le développement d'adjuvants pour (1) l'induction d'une immunité CD8 qui permettrait par exemple le développement de vaccins sous-unitaires thérapeutiques contre les cancers et (2)

l'induction d'une réponse Th1 pour l'éradication de pathogènes intracellulaires tels que les mycobactéries (Guy, 2007; Mbow, 2011).

### 3.4 ADJUVANTS VACCINAUX

Les adjuvants vaccinaux sont classiquement divisés en 2 catégories : les systèmes de délivrance et les molécules immunostimulantes (**Figure 23**). Les systèmes de délivrance permettent de transformer un antigène soluble en une entité particulière et multimérique (mimant la situation physiologique d'expression de nombreux antigènes) qui sera efficacement phagocytée ou endocytée par des APC. Les molécules immunostimulantes activent directement les APC et peuvent être utilisées en association avec les systèmes de délivrance permettant la libération spécifique d'un antigène soluble à une APC activée. De nombreux adjuvants sont en cours de développement clinique ou pré-clinique, mais peu sont commercialisés. Les adjuvants à base de sels d'aluminium (hydroxyde et phosphate d'aluminium ou alum) et les émulsions huile dans eau restent majoritairement utilisés, bien que leur mécanisme d'action ne soit pas entièrement compris. Une meilleure compréhension de ces mécanismes pourrait être bénéfique dans l'anticipation d'effets indésirables mais aussi pour la prédiction des réponses immunitaires effectrices induites.



**Figure 23 : Classification simplifiée des adjuvants en fonction de leur mode d'action**

Les APC (DC en particulier) sont au centre de l'activité adjuvante. Les adjuvants agissent en augmentant la capture antigénique par les APC ou en activant directement. En pratique de nombreux adjuvants combinent ces deux mécanismes, à des degrés variables. La nature de la réponse T helper (Th) induite est propre à chaque adjuvant. W/O : émulsions huile dans eau, O/W : émulsion eau dans huile. Adapté d'après (Guy, 2007)

### 3.4.1 Systèmes de délivrances

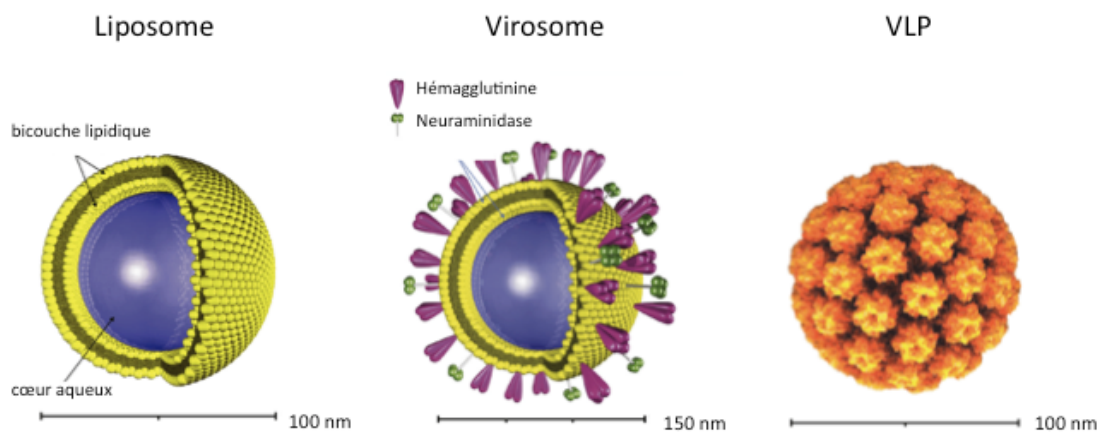
Les antigènes vaccinaux peuvent être encapsulés dans des particules afin d'augmenter leur taille et subséquemment leur phagocytose ou endocytose par les DC et macrophages (Bachmann, 2010). En fonction de leur taille les particules sont classifiées comme nanoparticules ( $<1\mu\text{m}$ ) ou microparticules ( $>1\mu\text{m}$ ). La taille des particules, concomitamment avec d'autres facteurs, influence la nature de réponses adaptatives induites (Oyewumi, 2010). En particulier l'endocytose de particules dont la taille est comprise entre 20 et 200 nm est favorable à la mise en place de réponses cytotoxiques (Bachmann, 2010). Les nanoparticules peuvent être constituées de polymères synthétiques (PLGA par exemple) ou d'une bicouche lipidique (liposomes et virosomes). Les antigènes d'intérêt sont adsorbés dans la bicouche lipidique, ou le plus souvent dans le cœur aqueux des liposomes et virosomes en fonction de leur hydro- ou lipo-philie. De même, les nanoparticules faites à base de polymères encapsulent l'antigène dans leur matrice, et le libèrent de façon contrôlée après administration *in vivo* (Gregory, 2013).

Les virosomes sont des liposomes dans lesquels des protéines virales telles que l'hémagglutinine et la neuraminidase des virus grippaux sont incorporées (**Figure 24**). En particulier l'hémagglutinine cible des membranes cellulaires en interagissant avec l'acide sialique (Amorij, 2012), améliorant ainsi la délivrance de l'antigène comparativement à un liposome. Ce ciblage peut être plus spécifique par l'incorporation d'agonistes de récepteurs spécifiquement exprimés par les DC. Par exemple l'incorporation de CpG à des nanoparticules permet le ciblage et l'activation spécifique des pDC dans les ganglions lymphatiques et l'induction d'une réponse CD8 (Bachmann, 2010).

Les VLP sont des capsides virales dépourvues de matériel génétique et donc incapables de se répliquer (**Figure 24**). Les vaccins Engerix<sup>TM</sup>-B, Cervarix<sup>TM</sup> et Gardasil<sup>®</sup> sont constitués de VLP, respectivement formés par l'auto-assemblage des antigènes HBs du virus de l'hépatite B et des antigènes de capside L1 de différents sérotypes d'HPV (human papillomavirus). Les VLP confèrent une immunité à l'encontre du virus dont ils sont issus, mais peuvent également présenter d'autres antigènes à leur surface et conférer une immunité contre plusieurs pathogènes (Gregory, 2013). A l'inverse des vaccins à base de virosomes, les vaccins à base de VLP sont peu immunogènes et doivent être adjuvantés (alum et AS04). La structure répétitive des VLP est favorable à la mise en place de réponses en anticorps (en particulier conformationnels), ces réponses pouvant être renforcées par l'incorporation d'agonistes TLR (Bachmann, 2010).

Certaines nanoparticules, notamment celles à base de polymères naturels (chitosan) ou synthétiques (PLGA) sont utilisées par voie orale et nasale pour leurs propriétés mucoadhésives et mucopénétrantes. Les particules de chitosan ont un effet direct sur la perméabilité épithéliale en relâchant les jonctions serrées (Islam, 2012). Ces particules permettent également le ciblage (actif ou passif) des cellules M, améliorant la biodisponibilité

de l'antigène pour les APC malgré la barrière épithéliale. Il est notable que la nature du polymère influence la nature des réponses immunitaires mises en place : par exemple l'acide polyacrylique stimule des réponses cytotoxiques tandis que le PLGA est plutôt inducteur de réponses immunitaires régulatrices en particulier Treg (Keijzer, 2011; Woodrow, 2012). De même, les virosomes peuvent être utilisés par voies muqueuses, notamment dans des vaccins ciblant des virus à tropisme muqueux (VIH, VRS ou virus grippaux). Par exemple l'administration d'un vaccin VIH à base de virosomes par voie i.m. et i.n. s'est avérée efficace dans l'induction de réponses sIgA protectrices dans la muqueuse vaginale chez le macaque (Bomsel, 2011).



**Figure 24 : Organisation structurale des liposomes, virosomes et VLP**

Les liposomes et virosomes sont constitués d'une bicouche lipidique et d'un cœur aqueux, dans lequel les antigènes sont incorporés (car ils sont hydrophiles le plus souvent). Les VLP s'auto-assemblent à partir d'une protéine de capsid virale. Toutes ces structures présentent la particularité d'exposer et de délivrer des répétitions de l'antigène. Adapté de (Garçon, 2011)

### 3.4.2 Adjuvants Immunostimulants

- Agonistes TLR et NLR

Les agonistes de TLR et NLR sont d'excellents activateurs d'APC et donc des réponses immunitaires adaptatives (**voir chapitre 1**). En particulier, l'utilisation d'agonistes de TLR en tant qu'adjuvants vaccinaux est fortement développée par voie systémique (**Tableau 7**). Le choix d'un adjuvant parmi ces agonistes est subordonné au type de réponse T/B effectrice à induire. Par voie sous-cutanée l'induction de réponses de type Th1 par les adjuvants R848 et Ribi (respectivement agonistes de TLR7/8 et TLR4) a été associé au recrutement de cellules NK dans les ganglions drainant et à leur production subséquente d'IFN- $\gamma$  (Martin-Fontecha, 2004). Une telle stratégie est particulièrement intéressante dans le contexte de pathologies allergiques et auto-immunes qui sont souvent associées à des réponses adaptatives non maîtrisées. Dans l'asthme, l'administration d'agonistes des TLR-7, -8 et -9 permettrait corriger la réponse immunitaire pro-Th2 du tractus respiratoire et de

l'orienter vers un phénotype Th1 qui accompagnerait d'une réduction de l'inflammation et des symptômes associés (Hennessy, 2010).

**Tableau 7: Propriétés des adjuvants vaccinaux ciblant les PRR**

Adjuvant	Major Immunostimulatory Component(s)	Innate Receptors or Pathway Activated	Principal Immune Responses Stimulated
<b>Licensed Adjuvants</b>			
Alum	aluminum salts	NLRP3 inflammasome (?)	Ab, Th2 (+ Th1 in humans)
MF59 and AS03	squalene-in-water emulsions	tissue inflammation (no receptors defined)	Ab, Th1 + Th2
AS04	MPL plus alum	TLR4 and inflammasome (?)	Ab, Th1
<b>Adjuvants in Widespread Experimental Use or in Late Stage Clinical Development</b>			
Poly-IC (also Poly-ICLC)	synthetic derivatives of dsRNA	TLR3, MDA5	Ab, Th1, CD8 <sup>+</sup> T cells
MPL and formulations (AS01, AS02)	MPL and QS-21	TLR4 (MPL), ? (QS21)	Ab, Th1
Flagellin, flagellin-Ag fusion proteins	Flagellin from <i>S. typhimurium</i>	TLR5	Ab, Th1 + Th2
Imiquimods	imidazoquinoline derivatives	TLR7, TLR8 or both	Ab, Th1, CD8 <sup>+</sup> T cells (when conjugated)
CpG oligodeoxynucleotides and formulations (IC31, QB10)	synthetic phosphothioate-linked DNA oligonucleotides with optimized CpG motifs	TLR9	Ab, Th1, CD8 <sup>+</sup> T cells (when conjugated)
CAF01	trehalose dimycolate (cord factor)	Mincle	Ab, Th1, Th17
ISCOMS and ISCOMATRIX	saponins	mechanism undefined	Ab, Th1+ Th2, CD8 <sup>+</sup> T cells
IFA (and Montanide formulations)	mineral or paraffin oil + surfactant	mechanism undefined	Ab, Th1 + Th2
CFA	IFA + peptidoglycan, trehalose dimycolate	NLR, inflammasome, Mincle, TLR?	Ab, Th1, Th17

D'après (Coffman, 2010)

### 3.4.3 Adjuvants à activité mixte

- QS21 et ISCOM

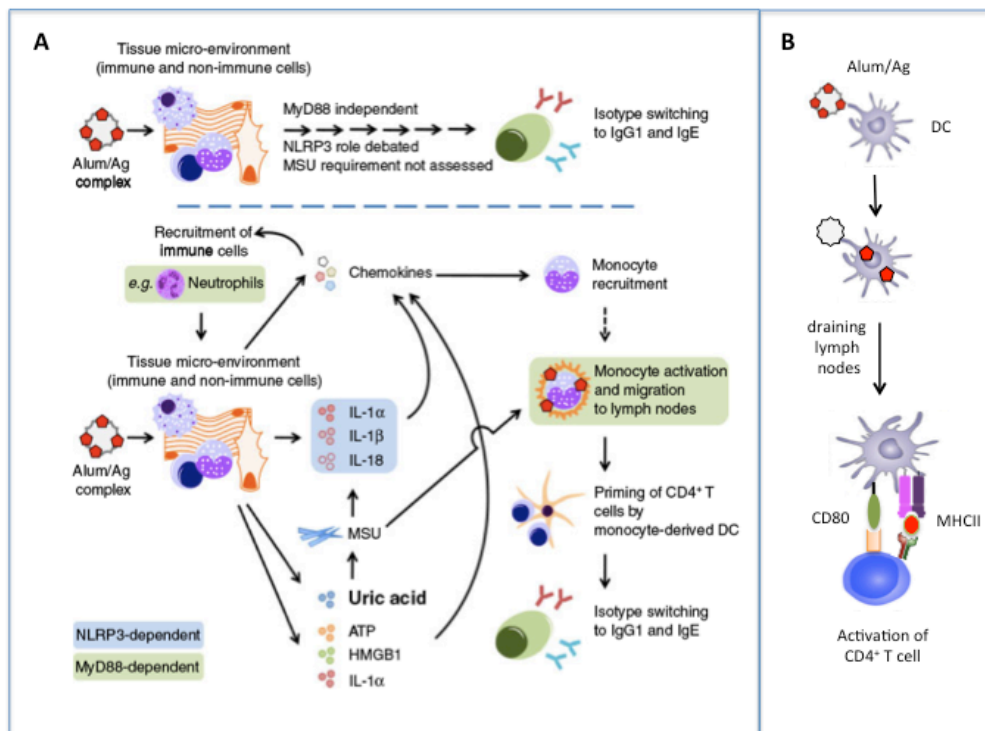
Le QS21 est un dérivé de saponine considéré comme immunostimulant notamment grâce à ses propriétés surfactantes et sa capacité à perméabiliser les membranes cellulaires. Des essais précliniques ont démontré son fort pouvoir adjuvant mais son utilisation chez l'Homme est limitée par sa toxicité et impose une formulation dans des ISCOM (immunostimulating complexes consisting of cholesterol and phospholipids), des liposomes (retrouvée dans l'adjuvant AS01) ou des émulsions (retrouvée dans l'adjuvant MF59) (Garçon, 2011; Leroux-Roels, 2010). Les ISCOM sont des formulations lipidiques, d'environ 40 nm de diamètre et dans lesquelles les antigènes vaccinaux sont incorporés. Les ISCOMatrix sont formulés de la même façon mais n'encapsulent pas l'antigène. Ces adjuvants stimulent des réponses Th1/Th2 et cytotoxiques ainsi que la production d'anticorps (Magnusson, 2013).

- Alum

Par voie systémique (intra-musculaire en particulier), l'effet adjuvant de l'alum se caractérise par de fortes réponses anticorps (IgG1) liés à une différenciation Th2 et/ou T<sub>FH</sub> (Hogenesch, 2012). Les mécanismes d'adjuvantité de l'alum sont multiples et restent encore mal compris. L'alum semble agir à la fois sur la délivrance de l'antigène et en tant qu'immunostimulant. Tout d'abord, l'adsorption de l'antigène sur les particules d'alum serait responsable d'un effet dépôt, à l'origine d'une libération progressive et prolongée de



l'antigène au site d'injection, augmentant ainsi la durée de stimulation antigénique et la probabilité de présentation par des APC (Tritto, 2009). Cependant cette hypothèse de dépôt antigénique a été remise en question par des études récentes de distribution d'antigènes fluorescents ou radiomarqués (Hutchison, 2012). Une autre hypothèse est que l'adsorption de l'antigène sur l'alum, notamment par le biais d'interactions électrostatiques, pourrait favoriser la présentation de structures antigéniques répétitives et ainsi augmenter son immunogénicité relative (Hogenesch, 2012; Tritto, 2009). L'effet immunostimulant de l'alum est TLR-indépendant mais MyD88-dépendant. Ainsi, il a été proposé que l'alum induise la nécrose de cellules au site d'injection (vraisemblablement non hématopoïétiques) ce qui entraînerait la libération d'acide urique, activateur de l'inflammasome NLRP3 (Kool, 2008). Par voie i.p., la nécrose locale induite par l'alum s'accompagne de la production de chimiokines permettant le recrutement de monocytes inflammatoires puis leur transdifférenciation en DC inflammatoires (*e.g.* moDC), responsables de la présentation antigénique dans les ganglions drainants (Kool, 2008) (**Figure 25**).



**Figure 25 : Mécanismes d'action de l'alum**

(A) Mécanisme d'activation indirecte (Kool, 2008). Les dommages tissulaires créés par l'injection d'alum activent l'inflammasome NLRP3 et stimulent le recrutement de monocytes inflammatoires. La différenciation de ces monocytes en DC et leur migration dans les ganglions drainants est à l'origine de l'activation des lymphocytes T. (B) Mécanisme d'activation directe des DC par l'alum proposé par Flach (Flach, 2011). L'alum interagit avec les lipides membranaires des DC et leur délivre spécifiquement l'antigène. La liaison alum/DC stimule l'expression de molécules de co-stimulation (CD80, CD86) et de liaison aux lymphocytes T (ICAM-1, non représenté) par les DC. Ces DC activées migrent dans les ganglions drainants et présentent efficacement l'antigène aux lymphocytes T CD4. Ag : antigène, DC : cellule dendritique, MSU : cristaux d'urate de sodium. Adapté de (Mbow, 2011; Spreafico, 2010).

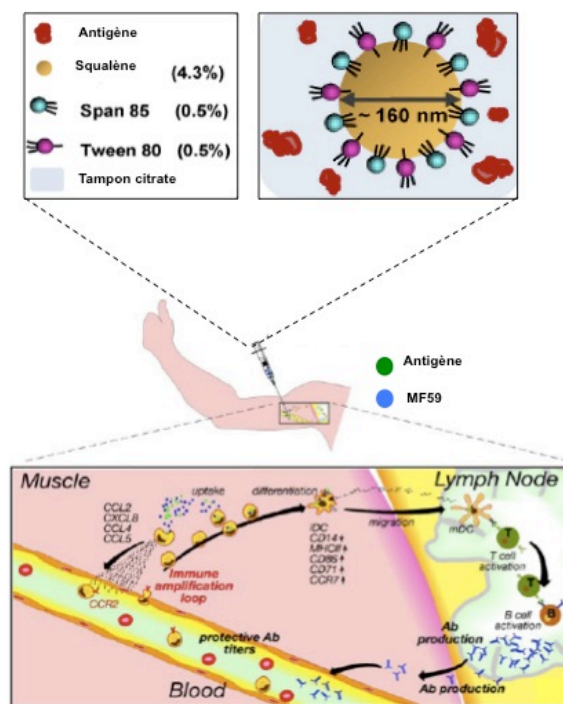
Alternativement l'ADN libéré par les cellules nécrotiques a été proposé comme responsable de l'immunostimulation de l'alum (Marichal, 2011), notamment en optimisant les interactions T/DC (McKee, 2013). Cependant, chez l'Homme la neutralisation de l'IL-1 $\beta$  n'affecte pas la réponse en anticorps induite par un vaccin adjuvanté avec l'alum, suggérant l'existence de mécanismes indépendants de l'inflammasome (Chioato, 2010). Enfin, des études *in vitro* ont suggéré que l'alum puisse également se fixer directement sur les DC par des interactions lipidiques, les activer et permettre l'endocytose des antigènes adsorbés (Flach, 2011; Hogenesch, 2012) (**Figure 25**). L'alum est donc un très bon adjuvant systémique mais sa capacité à stimuler spécifiquement des réponses Th2 limite son utilisation pour le développement de nouveaux vaccins.

- Emulsions et MF59

Les émulsions en cours de développement ou utilisées en clinique sont des émulsions huile dans eau, les émulsions eau dans huile s'étant avérées pour certaines toxiques chez l'Homme (adjuvant complet/incomplet de Freund par exemple) (Leroux-Roels, 2010). Cependant la forte réponse Th1 induite par les émulsions eau dans huile, telles que le montanide, est potentiellement très intéressante et fait l'objet d'essais cliniques dans le cadre de vaccins contre la malaria ou pour le traitement de cancers.

L'adjuvant MF59 contient du squalène, lipide naturellement synthétisé par l'Homme, et 2 agents tensio-actifs (**Figure 26**). Le MF59 est retrouvé dans des vaccins antigrippaux administrés par voie intramusculaire tels que Fludax® ou le vaccin pandémique H1N1 (Calabro, 2013). Tout comme l'alum son mécanisme d'action favorise à la fois la phagocytose de l'antigène (système de délivrance) (Seubert, 2008) et l'activation directe ou indirecte d'APC (immunostimulant) (Mosca, 2008). Le MF59 est très efficace dans l'induction de réponses Th2/Th1 et participe à accroître la nature polyclonale de la réponse en anticorps par le ciblage de nouveaux épitopes antigéniques, notamment chez les personnes âgées. L'administration du MF59 par voie i.n. chez l'Homme semble bien tolérée mais son efficacité dans le cadre de vaccins anti-grippaux est limitée comparativement à un vaccin non adjuvanté (Boyce, 2000). Dans le muscle l'administration de MF59 induit la création d'un environnement pro-inflammatoire au site d'injection favorable au recrutement et à l'activation d'APC. Ainsi les cellules hématopoïétiques résidentes mais aussi les fibres musculaires sont activées par l'injection de MF59 et produisent des chimiokines et cytokines pro-inflammatoires (Seubert, 2008) (Mosca, 2008). En particulier des monocytes inflammatoires, des PMN et dans une moindre mesure des DC CD11b<sup>high</sup> sont recrutés dans le muscle injecté, et y capturent l'antigène (Calabro, 2011). Par la suite l'antigène est transporté massivement vers les ganglions drainants, principalement par des monocytes et DC CD11b<sup>high</sup>. Ainsi le recrutement local de monocytes inflammatoires puis leur transdifférentiation en DC serait à l'origine de l'effet adjuvant du MF59 (O'Hagan, 2012). Cette hypothèse est corroborée par des études *in vitro* : le MF59 stimule la production de chimiokines par les monocytes,

macrophages et PMN humains ; et stimule l'acquisition d'un phénotype de DC matures par les monocytes (Seubert, 2008). Cependant il est important de noter que l'utilisation de souris  $Ccr2^{-/-}$ , a été limitée à l'étude du recrutement de monocytes inflammatoires au site d'injection (Dupuis, 2001). Ainsi l'impact des monocytes inflammatoires sur la réponse adjuvante du MF59 n'a pas été formellement démontré (De Gregorio, 2009). Enfin, il a été montré que seul le MF59 dans sa formulation vaccinale présente les propriétés adjuvantes précédemment décrites, au contraire de ses constituants utilisés séparément (Calabro, 2013). Bien que le MF59 n'active pas la signalisation TLR, son effet adjuvant est dépendant de MyD88 (Seubert, 2011). Au niveau moléculaire son effet adjuvant est indépendant de NLRP3, de la caspase-1 ou de l'IFN de type I (Caproni, 2012; Seubert, 2011).



**Figure 26 : Composition et mode d'action de l'adjuvant MF59**

Le MF59 est une émulsion de squalène dans un tampon citrate, stabilisée par deux agents tensioactifs (Span 85 et Tween 80). L'injection i.m. du MF59 stimule le recrutement local de cellules monocytaires et/ou de DC. La capture de l'antigène par ces cellules puis leur migration dans les ganglions drainants permet l'activation des lymphocytes T et B, et aboutit à la production d'anticorps. D'après (Calabro, 2013; Seubert, 2008).

- Adjuvants complexes

La société GlaxoSmithKline développe, également une série d'adjuvants complexes appelés « Adjuvant System » (AS), associant un système de délivrance à une ou plusieurs molécules immunostimulantes (**Tableau 8**). Le mode d'action de ces adjuvants ainsi que leur influence sur la réponse immunitaire n'est pas entièrement défini. L'administration i.m. d'un vaccin H5N1 adjuvanté avec l'AS03 induit une forte production d'anticorps neutralisants et une réponse Th1/Th2. Tout comme le MF59, l'AS03 crée un environnement pro-

inflammatoire au site d'injection de même que la migration de monocytes, de DC, et de PMN dans les ganglions drainants (Morel, 2011). L' $\alpha$ -tocophérol joue un rôle immunomodulateur et augmente la réponse en anticorps par rapport à l'émulsion seule. L'AS04 est composé de MPL adsorbé sur de l'alum : l'effet de l'agoniste TLR4 sur la production de cytokines est ainsi prolongé par l'alum. De plus le MPL conserve son action sur le recrutement d'APC dans les ganglions drainants et oriente la réponse la réponse fortement Th2 de l'alum vers une réponse Th1/Th2 (Didierlaurent, 2009). Dans le cadre du vaccin contre HPV, l'AS04 stimule une réponse en anticorps de plus intense et plus durable dans le temps comparativement à l'alum (Giannini, 2006). Ceci a été associé à une fréquence élevée de lymphocytes B mémoires dans le modèle murin mais aussi chez l'Homme.

**Tableau 8: Composition et application des systèmes adjuvants développés par GSK**

Nom	Composition		Applications
	système de délivrance	immunostimulant	
AS01	liposome	MPL, QS21	RTS,S, tuberculose
AS02	émulsion huile dans eau	MPL, QS21	RTS,S
AS03	émulsion huile dans eau	$\alpha$ -tocophérol, squalène	gripes saisonnière et pandémique (Arepanrix®, Pandemrix®)
AS04	alum	MPL	hépatite B (Fendrix®), HPV (Cervarix®)
AS15	liposome	MPL, QS21, CpG	cancer du poumon, mélanome

RTS,S : vaccin contre la malaria;  $\alpha$ -tocophérol (métabolite de la vitamine E) Adapté de (Leroux-Roels, 2010).

#### 3.4.4 Adjuvants muqueux

Certains adjuvants ayant démontré des caractéristiques d'immunogénicité et d'innocuité suffisantes sont testés dans le cadre de vaccins muqueux (**Tableau 9**). Les adjuvants muqueux présentent un triple intérêt : développer des vaccins muqueux à sous-unités ou tués, contourner les mécanismes de tolérance associées aux voies muqueuses et protéger les antigènes de la dégradation par le mucus ou les germes commensaux (Woodrow, 2012). Certains agonistes TLR sont utilisés par voie muqueuse. C'est notamment le cas des flagellines bactériennes agonistes de TLR5 et NLRC4 dont l'efficacité a été démontrée dans de nombreux modèles tels que *Streptococcus pneumoniae* (Nguyen, 2011), les virus grippaux (Huleatt, 2008), *Plasmodium vivax* (Bargieri, 2008) ou *Yersinia pestis* (Mizel, 2009). La flagelline peut être utilisée en co-administration avec l'antigène, ou liée à l'antigène de façon covalente sous forme de protéine de fusion. Par voie muqueuse, elle induit des réponses en anticorps sécrétoires et circulants ainsi que des réponses cellulaires de type Th1/Th2.

Le MPL, agoniste synthétique de TLR4, induit majoritairement des réponses T de type Th1 (par voies systémiques et muqueuses). Dans un modèle d'infection VRS chez la souris et le rat, l'administration i.n. de virosomes contenant du MPL stimule la production d'IgG systémiques et de sIgA et une protection supérieure à celle observée avec les virosomes seuls (Kamphuis, 2013). De même, le MPL s'est montré efficace et bien toléré chez l'Homme lors d'une administration i.n. en association avec du chitosan dans un VLP du virus Norwalk (El-Kamary, 2010; Ramirez, 2012).

**Tableau 9 : Principaux adjuvants muqueux en développement**

Type of adjuvant or delivery system	Composition	Target	Formulation	Immuno-enhancement	Mucosal IgA	Clinical testing?	Licensed vaccine?
TLR ligands	MDP	TLR2	Soluble or conjugated	T <sub>H</sub> 1 cells, T <sub>H</sub> 2 cells	+	Yes	No
	MPL	TLR4	Emulsion or liposomes	T <sub>H</sub> 1 cells, CTLs	+	Yes	No
	Flagellin	TLR5	Soluble or conjugated	T <sub>H</sub> 1 cells, CTLs T <sub>H</sub> 2 cells	++	Yes	No
	CpG	TLR9	Soluble, with or without PLG or CTB	T <sub>H</sub> 1 cells, CTLs	-	Yes	No
Enterotoxins	CT	GM1	Soluble or conjugated	T <sub>H</sub> 2 cells, T <sub>H</sub> 17 cells, CTLs	+++++	Yes	No
	CTB	GM1	Soluble or conjugated	ND	+	Yes	Yes
	CTA1-DD	Immuno-globulin heavy chain, complement	Soluble, conjugated to nanoparticles or incorporated in ISCOMs	T <sub>H</sub> 1 cells, T <sub>H</sub> 2 cells, T <sub>H</sub> 17 cells, CTLs	+++++	No	No
	LT	GM1 and other gangliosides	Soluble or conjugated	T <sub>H</sub> 1 cells, T <sub>H</sub> 2 cells, T <sub>H</sub> 17 cells, CTLs	+++++	Yes	No
	Mutant LT and CT	GM1 and other gangliosides	Soluble or conjugated	T <sub>H</sub> 1 cells, T <sub>H</sub> 2 cells, T <sub>H</sub> 17 cells, CTLs	++++	Yes	No
Mucoadhesives	Chitosan	Tight junctions	Soluble or conjugated	T <sub>H</sub> 2 cells	++	Yes	No
	Lectins (such as UEA1)	M cells	Conjugated	ND	+	No	No
Particles	PLG	ND	Microspheres	T <sub>H</sub> 1 cells, CTLs	+	Yes	No
	Virus envelopes	ND	VLPs	T <sub>H</sub> 1 cells, T <sub>H</sub> 2 cells, CTLs	++	Yes	Yes
	Bacterial cell membranes	ND	BCVs	T <sub>H</sub> 1 cells, CTLs	+	Yes	No
	Phospholipids	ND	Liposomes	T <sub>H</sub> 1 cells, T <sub>H</sub> 2 cells	+	Yes	No
	Quillaja saponins	DCs	ISCOMs or ISCOMATRIX	T <sub>H</sub> 1 cells, T <sub>H</sub> 2 cells, CTLs	++	Yes	No
Saponins	Quillaja saponins fraction		QS21 soluble	T <sub>H</sub> 1 cells, T <sub>H</sub> 2 cells, CTLs	+	Yes	No
Oil-in-water and water-in-oil emulsions	Cationic DDA or liposomes	DC uptake	Liposomes	T <sub>H</sub> 1 cells, CTLs	++	Yes	No
	Squalene	ND	MF59	T <sub>H</sub> 1 cells	-	No	No
	Montanide ISA-51 or Montanide ISA-720 VG	ND	Montanide	T <sub>H</sub> 1 cells	ND	Yes	No
	α-galactosylceramide	CD1d	Soluble	Vα14 <sup>+</sup> iNKT cells	++	No	No
Cytokines	IL-1	IL-1R	Soluble or plasmid DNA	T <sub>H</sub> 1 cells, T <sub>H</sub> 2 cells, CTLs	+++	No	No
	IL-12	IL-12R	Soluble or plasmid DNA	T <sub>H</sub> 1 cells, CTLs	+	No	No

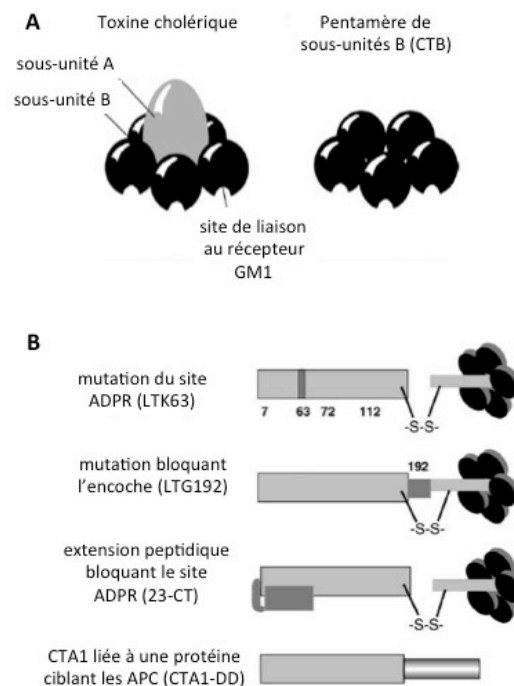
D'après (Lycke, 2012)

Les nucléotides présentant des motifs CpG bactériens sont des adjuvants efficaces par voie systémique et muqueuse (intranasale, intrarectale et orale) et stimulent principalement des réponses Th1. Par voie intranasale, l'adjuvantité du CpG a été liée à l'activation de cellules CD11c<sup>+</sup> (DC et macrophages alvéolaires) (Pesce, 2010), tandis que les cellules épithéliales alvéolaires ne répondent pas au CpG. De plus le recrutement et l'activation de pDC et de cellules NK dans le tissu pulmonaire, est à l'origine de la clairance bactérienne (Pesce, 2010).

- Les toxines comme adjuvants muqueux

La toxine cholérique (CT) et la toxine thermolabile d'*E. coli* (LT) sont les adjuvants muqueux les plus puissants, mais leur toxicité limite leur utilisation clinique. En particulier, un vaccin anti-grippal administré par voie intranasale et adjuvanté par la LT a été retiré du marché car il a été incriminé dans l'apparition de paralysies faciales. Ces troubles ont été associés à la diffusion de la LT au niveau du bulbe olfactif et à l'induction de réponses inflammatoires exagérées à ce niveau (Couch, 2004). Les toxines CT et LT sont constituées de 2 sous-unités : la sous-unité B qui se lie aux gangliosides GM1 des membranes cellulaires ; et la sous-unité A qui supporte l'activité enzymatique toxique (ADP-ribosylation ou ADPR) (**Figure 27**). Des mutants non toxiques (c'est à dire dépourvus d'activité ADPR) de LT et CT ont été générés afin de réduire la toxicité lors de la vaccination (**Figure 27**). Le mutant LTK63, quoique très fortement atténué *in vitro*, a révélé une toxicité après administration i.n. dans un essai clinique de phase I (Lewis, 2009). A l'inverse, le mutant LTR192G/L211A semble concilier efficacité et tolérance, et sa résistance à la trypsine autorise son utilisation par voie orale (Lycke, 2012). Son utilisation par voie transcutanée fait également l'objet d'un essai clinique de phase I visant à protéger contre les diarrhées à *E. coli* entérotoxigène ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), NCT01382095).

La protéine de fusion CTA1-DD développée par l'équipe de Nils Lycke associe la sous-unité A de la CT à un dimère de fragment D de la protéine A de *Staphylococcus aureus*. L'absence de la sous-unité B prévient la fixation aux gangliosides GM1 et réduit la toxicité de cet adjuvant dans des modèles animaux (Lycke, 2012). Administré par voie i.n. mais aussi rectale, et systémique l'adjuvant CTA1-DD stimule des réponses T CD4 et CD8, une réponse en anticorps T-dépendante (IgG et sIgA par voie muqueuse) de forte affinité et stable dans le temps (Lycke, 2010). L'utilisation de la CTA1-DD par voie orale nécessite son incorporation dans des ISCOM afin de prévenir sa dégradation. Par voie i.p. cette réponse en anticorps induite par le CTA1-DD a été associée à génération de nombreux centres germinatifs dans la rate, et à une fréquence élevée de mutations hypersomatiques (Bemark, 2011). Dans les muqueuses, l'effet adjuvant des toxines CT, LT et leurs dérivés non toxiques est lié à l'augmentation de la capture de l'antigène par les APC (par augmentation de la perméabilité épithéliale), ainsi que de leurs capacités à présenter l'antigène (Holmgren, 2005).



**Figure 27 : Structure de la toxine cholérique et de dérivés atténués**

(A) La sous-unité A, à activité ADP-ribosyltransférase (ADPR), est responsable de la toxicité ; la sous-unité B se lie sur les récepteurs GM1 des cellules. Le développement d'adjuvant non toxiques nécessite la suppression complète de la sous-unité A (A) ou l'introduction de mutations réduisant spécifiquement sa toxicité (B). D'après(Holmgren, 2005)

- Cytokines

Des cytokines telles que l'IL-1 et l'IL-12 présentent une activité adjuvante par voie muqueuse, en particulier par la voie nasale (Boyaka, 2001). L'activité adjuvante muqueuse de l'IL-1 $\alpha$  a été associée à l'activation directe du récepteur IL-1R1 sur des cellules hématopoïétiques CD11c<sup>+</sup> (Thompson, 2012). Kayamuro *et al.* ont testé les propriétés adjuvantes par voie intranasale de 26 cytokines (Kayamuro, 2010). Parmi ces cytokines, les cytokines de la famille de l'IL-1 (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18 et IL-33) se sont avérées les plus efficaces, induisant en particulier des IgG sériques, des IgA sécrétoires (salive, lavage nasal, lavage vaginal) ainsi que des réponses Th1/Th2 et cytotoxiques (Kayamuro, 2010). Des vaccins associant ces cytokines à de l'hémagglutinine recombinante du virus Influenza se sont avérés protecteurs vis à vis d'infection grippales. De plus, l'utilisation en association de cytokines pouvant activer les DC (IL-1, IL-12, IL-18 et GM-CSF) a été montrée comme amplifiant les réponses anticorps générées (IgG1 et IgG2a sériques et IgA muqueuses) dans un modèle de vaccin anti-VIH (Bradney, 2002). Bien que prometteuse dans le modèle murin, l'utilisation de cytokines comme adjuvant chez l'Homme et les primates non humains reste

cependant limitée à leur injection i.m. dans le cadre de vaccins expérimentaux à ADN (Kalams, 2012; Kalams, 2013; Winstone, 2011).

A l'heure actuelle, les infections induites par les pathogènes muqueux représentent un problème majeur de santé publique. Le développement de vaccins efficaces par ces voies pourrait palier à ce problème mais requiert l'utilisation d'adjuvants muqueux combinant efficacité et innocuité. Toutefois la recherche et le développement de nouveaux vaccins est un processus long et coûteux, et dont la rentabilité dépend en grande partie de son inscription au calendrier vaccinal par les autorités de santé. Ainsi de nombreux obstacles, scientifiques ou non, freinent la mise sur le marché de vaccins adjuvantés à usage muqueux.



# Etude expérimentale

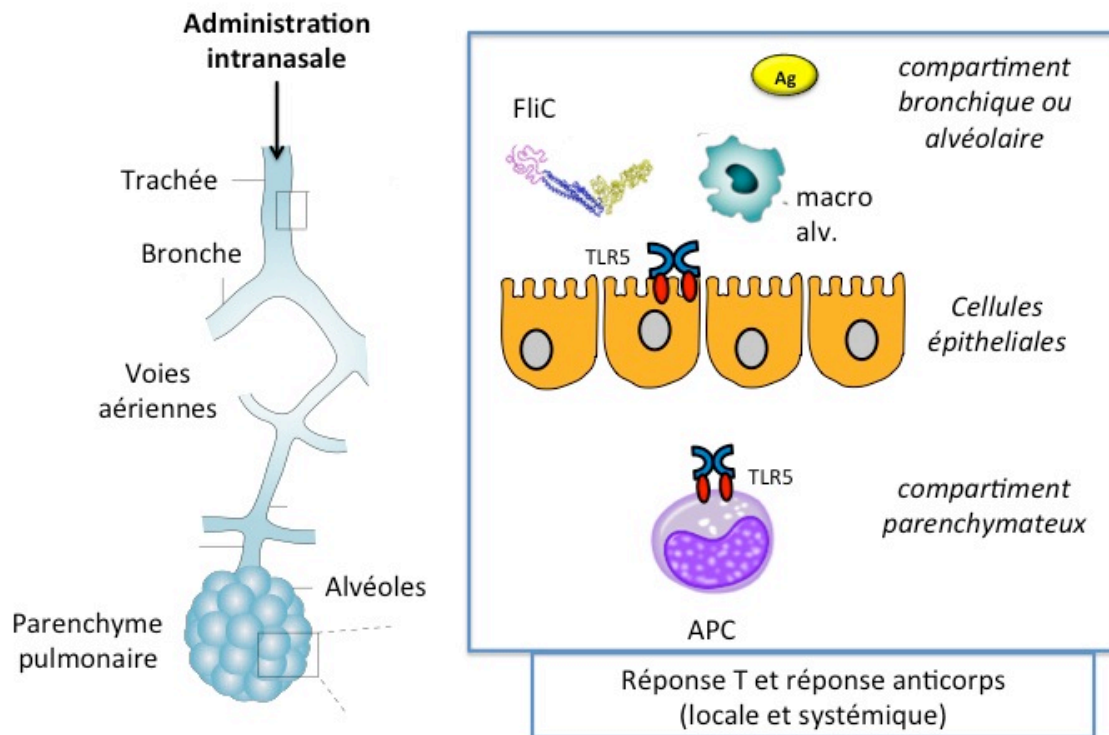
---

## 1 Objectifs du projet de recherche

De nombreux pathogènes envahissent ou colonisent leur hôtes au travers des muqueuses telles que les muqueuses bucco-orales digestives, respiratoires ou génitales. Parmi ces pathogènes, certains sont la cause de pathologies graves à fort potentiel épidémique (SIDA, grippe, poliomyélite, choléra...). La production d'effecteurs immunitaires spécifiques de ces pathogènes au niveau des muqueuses est considérée comme un facteur déterminant dans la défense contre les infections associées. Ainsi, la lutte contre la poliomyélite a bénéficié de l'immunité muqueuse conférée par le vaccin oral, empêchant la contamination de nouveaux individus et la circulation des pathogènes dans l'environnement. Cependant pour les pathogènes ciblant les voies génitales et pulmonaires, la majorité des vaccins actuels sont administrés par voie systémique et empêchent en particulier l'invasion du compartiment systémique et la symptomatologie associées. Ainsi, le développement de nouveaux adjuvants, en particulier à usage muqueux, représente un enjeu capital dans la lutte contre de nombreuses infections muqueuses telles que les infections à VIH, la tuberculose, les gripes saisonnières et les infections à virus respiratoires émergents de nature pandémique (Harandi, 2010).

En tant qu'agoniste de TLR5, la flagelline présente des propriétés adjuvantes dont le potentiel est exploité dans des vaccins systémiques mais aussi muqueux. Actuellement, il est admis que la majorité des adjuvants vaccinaux ciblent directement les APC (en particulier les DC) lorsqu'ils sont administrés par voie systémique. Conformément à ce dogme, par voie sous-cutanée, l'activation directe de TLR5 sur les DC a été montrée comme stimulant l'immunité Th1 et Th2 de façon MyD88 dépendante (Didierlaurent, 2004). In vitro, l'activation de DC murines ou humaines a également pu être démontrées (Agrawal, 2003; Bates, 2009; Honko, 2006; Kinnebrew, 2012; Means, 2003; Pino, 2005; Salazar-Gonzalez, 2005; Salazar-Gonzalez, 2007; Sanders, 2008; Uematsu, 2006; Van Maele, 2010). Au laboratoire, nous nous intéressons aux propriétés immunostimulatrices de la flagelline FliC de *S. enterica Serovar Typhimurium* au niveau de la muqueuse pulmonaire. En particulier ses propriétés de modulation de l'immunité adaptative sont étudiées dans un modèle murin où des préparations vaccinales contenant la flagelline et l'antigène ovalbumine sont administrées par voie nasale pulmonaire. Par voie muqueuse (en particulier intranasale) des vaccins utilisant la flagelline comme adjuvant ont été montrés comme protecteurs vis-à-vis d'infections grippales (Hong, 2012) et d'infections à *Yersinia pestis* (Bates, 2011; Honko, 2006). En particulier la stimulation de la production d'IgG et d'IgA sériques et muqueuses spécifiques de l'antigène vaccinal améliore la survie lors d'infections. Certaines études rapportent que les réponses en anticorps et les réponses cellulaires cytotoxiques (T CD8) stimulées par la flagelline sont dépendantes d'un couplage physique avec l'antigène (Bargieri, 2008; Nguyen, 2011). Cet effet cargo du TLR sur l'antigène proposé initialement dans le contexte du récepteur TLR4

repose sur la co-localisation de l'antigène et de l'agoniste TLR au sein d'un même endosome intracellulaire, permettant ainsi un apprêtement et une présentation optimale de l'antigène aux cellules T (Blander, 2006). Cependant les mécanismes impliqués dans l'induction des réponses adaptatives, en particulier l'activation des APC muqueuses, n'ont pas été rigoureusement analysés. En effet par voie muqueuse (et notamment pulmonaire), la barrière épithéliale sépare le compartiment alvéolaire contenant la flagelline, du compartiment parenchymateux contenant les APC professionnelles (**Figure 28**).



**Figure 28 : Représentation schématique du modèle d'étude de la vaccination pulmonaire**

La flagelline et l'antigène sont administrés par voie i.n et se localisent dans la lumière alvéolaire. A l'exclusion des macrophages alvéolaires, seulement présent dans les alvéoles pulmonaires, les cellules hématopoïétiques présentant un potentiel en tant qu'APC sont interstitielles (i.e. insérées dans le parenchyme pulmonaire). Les compartiments alvéolaires et parenchymateux sont séparés par une barrière constituée de cellules épithéliales. Les cellules épithéliales bronchiques et alvéolaires diffèrent dans leur structure et leur forme mais leur fonction de barrière est similaire. *Macro alv.* : *macrophage alvéolaire*

Dans ce contexte, une stimulation directe des APC muqueuses par l'agoniste TLR est donc peu probable. Les cellules stromales des muqueuses, en plus de leur rôle de barrière physique, constituent de véritables sentinelles et leur fonction dans l'initiation de réponses immunitaires innées et adaptatives a récemment été mis en évidence (Hammad, 2009; Janot, 2009; Unkel, 2012). Ainsi, des travaux précédents de notre laboratoire ont montré que l'induction de l'immunité innée au sein du tractus respiratoire en réponse à l'administration nasale de flagelline, dépend principalement de la signalisation TLR5 dans le compartiment

radio-résistant (Janot, 2009). L'ensemble de ces récents travaux nous a donc conduit à considérer que l'effet adjuvant muqueux de la flagelline était également sous la dépendance du compartiment radio-résistant dans le contexte respiratoire.

*Les objectifs du travail de thèse ont été de :*

- 1) déterminer le rôle de la signalisation TLR5 stromale et hématopoïétique dans la mise en place de l'effet adjuvant muqueux de la flagelline,*
- 2) caractériser les APC recrutées/activées par l'administration intranasale de flagelline au niveau pulmonaire et dans les ganglions drainants, ainsi que leurs rôles dans l'effet adjuvant*
- 3) analyser in vivo et in vitro les facteurs nécessaires à l'activation des APC pulmonaires.*

## 2 Article 1 : L'effet adjuvant muqueux de la flagelline est régulé par la signalisation TLR5 dans les cellules épithéliales bronchiques

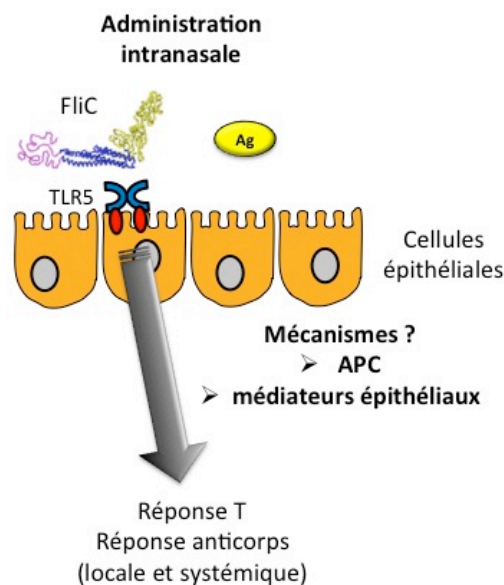
### 2.1 INTRODUCTION

Par voie systémique, le rationnel de l'utilisation de la flagelline comme adjuvant vaccinal, repose sur ses capacités à activer TLR5 sur les APC et déclencher leur maturation. Cependant par voie muqueuse, en particulier pulmonaire, cette activation directe peut être affectée par la barrière épithéliale. Comme précédemment mentionné, les cellules stromales peuvent être impliquées dans la régulation et/ou l'initiation des réponses immunitaires. Par exemple, suite à l'administration i.n. de flagelline, il a été montré que la signalisation TLR5 stromale est impliquée dans l'infiltration de PMN dans le tissu pulmonaire (Janot, 2009). Par ailleurs la signalisation TLR4 épithéliale a été mise en cause dans le processus de sensibilisation aux allergènes inhalés et la mise de place de réponses allergiques de type Th2 (Hammad, 2009; Tan, 2010).

Ainsi, le but de cette première étude était de déterminer le rôle de la signalisation TLR5 dans le compartiment stromal et son impact sur l'effet adjuvant muqueux de la flagelline. Nous avons tout d'abord montré que la signalisation TLR5, contrairement à la signalisation NLRC4, était indispensable à l'effet adjuvant muqueux de la flagelline. Par la suite nous avons cherché à déterminer si la dépendance de TLR5 à l'effet adjuvant pouvait être spécifiquement attribuée aux cellules hématopoïétiques (c'est-à-dire aux APC) ou aux cellules stromales. Pour cela nous avons généré des souris chimères exprimant exclusivement TLR5 dans le compartiment radio-résistant (c'est-à-dire dans les cellules stromales ainsi que certaines populations hématopoïétiques tels les macrophages) ou dans le compartiment radiosensible (c'est-à-dire dans les cellules hématopoïétique telles les DC et les lymphocytes). Ces souris chimères  $Tlr5^{-/-} \rightarrow WT$  et  $WT \rightarrow Tlr5^{-/-}$  ont été immunisées par voie intranasale avec un modèle de vaccin adjuvanté par la flagelline (co-administration de flagelline et d'antigène(s)). L'effet adjuvant a été mesuré par la production d'anticorps dans les sécrétions respiratoires et le sérum, ainsi que par la réponse lymphocytaire dans les ganglions. Il est apparu que la stimulation des réponses adaptatives systémiques et locales est régulée quasi-exclusivement par la signalisation TLR5 dans le compartiment stromal. Nos résultats montrent que la signalisation TLR5 dans le compartiment hématopoïétique contribue de façon mineure à l'effet adjuvant muqueux, et infirment l'hypothèse d'une activation directe des APC pulmonaires par la flagelline.

Enfin, ces données ont été corroborées *in vivo* et *in vitro* par l'analyse du transcriptome induit par la flagelline dans le poumon et dans des cellules épithéliales bronchiques et alvéolaires des souris. Ces expériences ont montré que la production d'une grande quantité de cytokines et chimiokines observée suite à l'instillation de flagelline peut être attribuée aux cellules épithéliales. Une signature pro-inflammatoire similaire a été retrouvée *in vitro* en particulier lors de l'activation de cellules humaines bronchiques (BEAS-2B).

En conclusion, nos travaux positionnent les cellules structurales à l'origine de l'activité adjuvante de la flagelline au niveau de la muqueuse respiratoire. Ces observations nous ont permis d'établir un nouveau modèle d'étude (**Figure 29**) posant notamment des questions quant au devenir de l'antigène, à la nature des APC responsables de la capture et présentation antigénique et aux facteurs épithéliaux responsables de la transactivation des APC.



**Figure 29 : La signalisation TLR5 épithéliale régule l'effet adjuvant muqueux de la flagelline.**

L'effet adjuvant de la flagelline par voie i.n. est dépendant de l'expression de TLR5 et de la signalisation sur les cellules stromales pulmonaires mais indépendant de l'expression de TLR5 sur les cellules hématopoïétiques. Ce modèle d'étude pose de nouvelles questions sur la nature des APC recrutées et/ou activées au niveau pulmonaire ainsi que sur les signaux épithéliaux responsables de ces phénomènes.

**2.2 ARTICLE 1**

Publié en Septembre 2013 dans Mucosal Immunology

**Airway structural cells regulate TLR5-mediated mucosal adjuvant activity**

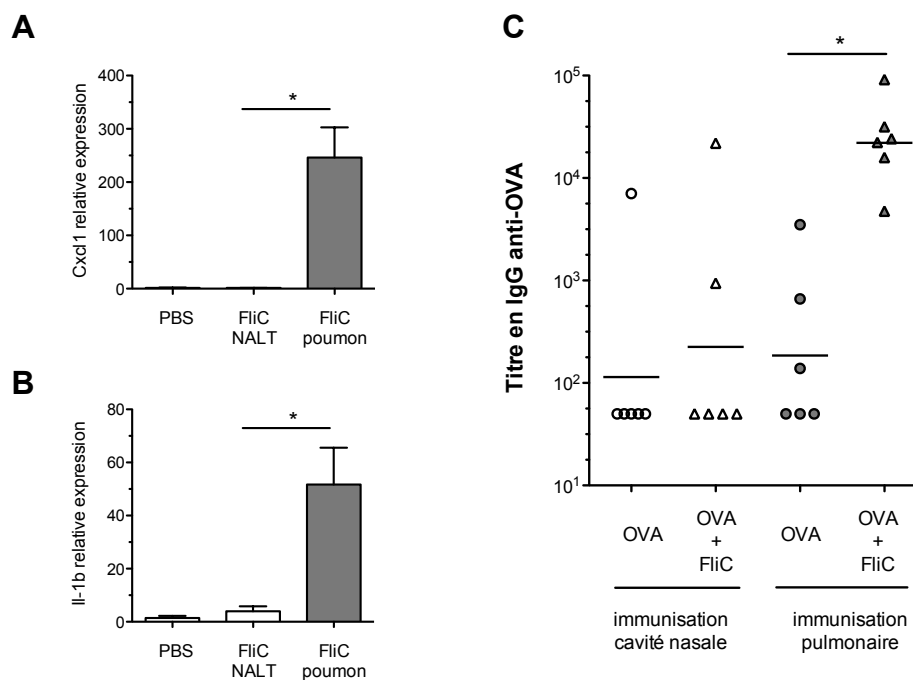
L Van Maele<sup>1,2,3,4,14</sup>, D Fougeron<sup>1,2,3,4,14</sup>, L Janot<sup>5,6,14</sup>, A Didierlaurent<sup>7</sup>, D Cayet<sup>1,2,3,4</sup>, J Tabareau<sup>1,2,3,4</sup>, M Rumbo<sup>8</sup>, S Corvo-Chamaillard<sup>1,2,3,4</sup>, S Boulouvar<sup>1,2,3,4</sup>, S Jeffs<sup>9</sup>, L Vande Walle<sup>10,11</sup>, M Lamkanfi<sup>10,11</sup>, Y Lemoine<sup>1,2,3,4</sup>, F Erard<sup>5,6</sup>, D Hot<sup>1,2,3,4</sup>, T Hussell<sup>7,12</sup>, B Ryffel<sup>5,6</sup>, AG Benecke<sup>13</sup> and J-C Sirard<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Institut Pasteur de Lille, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Lille, France. <sup>2</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Lille, France. <sup>3</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, Lille, France. <sup>4</sup>Univ Lille Nord de France, Lille, France. <sup>5</sup>University of Orleans, Orleans, France. <sup>6</sup>CNRS Molecular Immunology and Embryology UMR 6218, Institut de Transgenèse, Orleans, France. <sup>7</sup>Imperial College of London, National Heart and Lung Institute, London, UK. <sup>8</sup>Universidad Nacional de La Plata, Laboratorio de Investigaciones en el Sistema Inmune, Facultad de Ciencias Exactas, La Plata, Argentina. <sup>9</sup>Jefferiss Trust Research Laboratories, Imperial College, London, UK. <sup>10</sup>Department of Medical Protein Research, VIB, Ghent, Belgium. <sup>11</sup>Department of Biochemistry, Ghent University, Ghent, Belgium. <sup>12</sup>Manchester Collaborative Centre for Inflammation Research, University of Manchester, Manchester, UK and <sup>13</sup>Institut des Hautes Etudes Scientifiques and Centre National de la Recherche Scientifique, Bures-sur-Yvette, France. Correspondence: J-C Sirard (jean-claude.sirard@inserm.fr)

<sup>14</sup>These authors contributed equally to this work.

### 2.3 RESULTATS COMPLEMENTAIRES A L'ARTICLE 1

De façon complémentaire nous avons approché d'autres caractéristiques du mécanisme de l'effet adjuvant de la flagelline par voie intranasale. En particulier nous avons montré que la prise en charge de l'antigène et l'activation par la flagelline au niveau nasal (et par conséquence du tissu lymphoïde associé ou NALT) ne sont pas suffisants en tant que tels à l'effet adjuvant. Dans ce but, nous avons administré par voie intranasale deux groupes d'animaux avec des volumes distincts de préparation vaccinale : une formulation de 5 $\mu$ l qui reste principalement au niveau du conduit nasal et une formulation de 30 $\mu$ l qui est capable de pénétrer dans la partie basse du tractus pulmonaire. Ainsi lors d'une administration vaccinale limitée à la cavité nasale et au NALT, la flagelline n'active pas la production de cytokines (telles que *Cxcl1* ou *Il1b*) dans le compartiment pulmonaire (**Figure S1.A-B**) et ne stimule pas de réponse adaptative systémique (**Figure S1.C**). Comme attendu, la formulation vaccinale standard (à distribution pulmonaire) stimule parfaitement les réponses adaptatives. Ces résultats indiquent que la vaccination exclusivement nasale n'est pas suffisante à l'effet adjuvant.

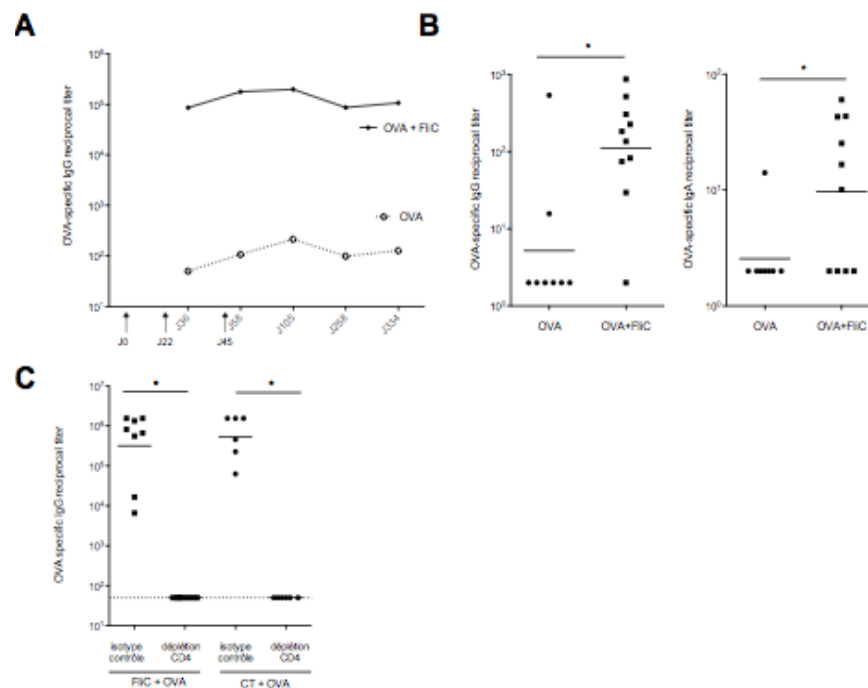


**Figure S1 : L'effet adjuvant muqueux de la flagelline requiert une diffusion pulmonaire de la préparation vaccinale**

Des souris NMRI (n=4-6) ont été immunisées avec la flagelline (FliC, 1 $\mu$ g)  $\pm$  l'ovalbumine (OVA, 10  $\mu$ g) dans un volume de 5 $\mu$ L ou 30  $\mu$ L correspondant respectivement à une immunisation de la cavité nasale (NALT) ou pulmonaire. Le poumon a été prélevé 2h après administration pour analyse en PCR quantitative. Les histogrammes représentent l'expression relative des gènes codant pour CXCL1 (A) et l'IL-1 $\beta$  (B). (C) L'effet adjuvant généré par des immunisations OVA ou OVA+FliC de la cavité nasale ou du poumon total a été mesuré 21 jours après immunisation, par titration des IgG anti-OVA sériques.



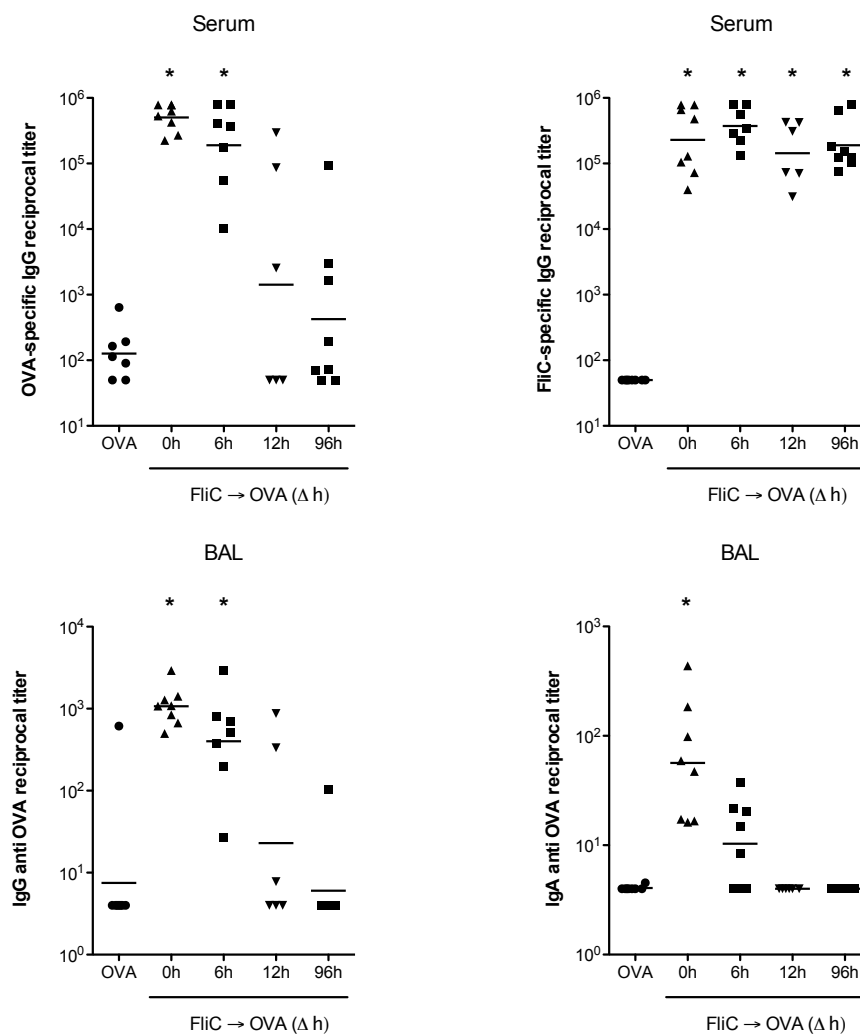
Nous avons également caractérisé la durée de la réponse adaptative suite à la vaccination nasale avec la flagelline. La réponse en anticorps a été analysée dans le sérum et le lavage broncho-alvéolaire (**Figure S2.A-B**). Il est remarquable que le niveau d'anticorps circulants se maintienne à des taux élevés durant plus de 300 jours en l'absence de challenge antigénique (**Figure S2.A**). Au jour 334, des taux significatifs d'anticorps IgG et IgA ont pu être détectés dans les sécrétions respiratoires de ces animaux (**Figure S2.B**). Comme démontré avec d'autres adjuvants tels que CTA1-DD (Bemark, 2011), l'induction spécifique de lymphocytes T<sub>FH</sub> dans les ganglions drainants et/ou systémiques pourrait être à l'origine de la persistance de la réponse immunitaire induite par la flagelline. Cette hypothèse est d'autant plus intéressante que l'induction des réponses en anticorps induites par la flagelline intranasale est totalement dépendante de la réponse T CD4. En effet, nous avons montré que la déplétion des lymphocytes T CD4 avant l'immunisation nasale abroge totalement la production d'anticorps sériques spécifiques de l'antigène administré par voie nasale avec la flagelline (**Figure S2.C**). Néanmoins l'influence des lymphocytes T CD4 ainsi que l'activation du NALT n'ont pas été analysés en terme de réponse IgA sécrétoire. Ces résultats montrent que l'adjuvant flagelline induit une très bonne réponse mémoire systémique dépendante des lymphocytes T CD4.



**Figure S2 : La flagelline est un adjuvant muqueux qui stimule une réponse en anticorps persistante et CD4-dépendante**

Des souris NMRI (n=8) ont été immunisées avec de l'ovalbumine (OVA, 10 µg) ± la flagelline (FliC, 1 µg) ou la toxine cholérique (CT, 1 µg). (A-B) Un protocole d'immunisation à J0, J22 et J45 a été utilisé et le taux d'IgG anti-OVA a été suivi jusqu'à J334 dans le sérum (A). (B) Les titres en IgG et IgA ont également été mesurés dans le lavage broncho-alvéolaire à J334. (C) Les lymphocytes T CD4 ont été déplétés par injection i.p. de 200 µg d'anticorps anti-CD4 (GK1.5) ou d'isotype (HB152). Après 24h, les souris ont été immunisées par voie nasale avec OVA+FliC ou OVA+CT et la réponse anticorps a été mesurée à J21 dans le sérum.

Pour des adjuvants tels que la MF59 ou l'AS04, par voie intramusculaire, il a été montré que l'administration de l'antigène et de l'adjuvant pouvait être découplée dans le temps (Didierlaurent, 2009; O'Hagan, 2012). Cependant l'adjuvant doit impérativement être administré avant l'antigène et le site d'administration doit être identique. Pour déterminer si un tel découplage est opérationnel dans la vaccination muqueuse avec l'agoniste de TLR5, nous avons réalisé une expérience d'immunisation nasale séquentielle. Dans ce but, la flagelline a été administrée par voie i.n. au temps 0h, et l'antigène Ovalbumine a ensuite été administré de façon retardée à différents temps, également par voie i.n. Ainsi, nous avons observé que l'antigène pouvait être administré jusqu'à 6h après l'administration de flagelline sans perte d'effet adjuvant (**Figure S3**).



**Figure S3 : Le couplage physique de l'antigène à l'adjuvant n'est pas nécessaire à l'effet adjuvant muqueux de la flagelline**

Des souris NMRI (n=6-8) ont été immunisées par voie i.n. avec la flagelline (FliC, 1  $\mu$ g). L'administration de l'ovalbumine (OVA, 10  $\mu$ g) a été effectuée de façon simultanée à celle de la flagelline (0h) ou avec un délai de 6h à 96h. L'effet adjuvant de la flagelline sur la réponse en anticorps dirigée contre l'ovalbumine a été mesuré dans le sérum à J21 et dans le BAL. La réponse en anticorps spécifiquement dirigés contre la flagelline a également été mesurée dans le sérum à J21.

Ces données supposent donc que la création d'un environnement pro-inflammatoire local est favorable à l'induction d'effet adjuvant. Cela suggère également que le couplage de l'antigène à l'adjuvant n'est pas un facteur critique à la stimulation effective d'une réponse adaptative.

Ces résultats montrent que l'effet adjuvant muqueux de la flagelline dépend principalement de la stimulation épithéliale de TLR5 et du dialogue s'établissant par la suite avec les cellules hématopoïétiques. Cette stimulation est à l'origine d'une réponse anticorps T-dépendante et particulièrement durable dans le temps.

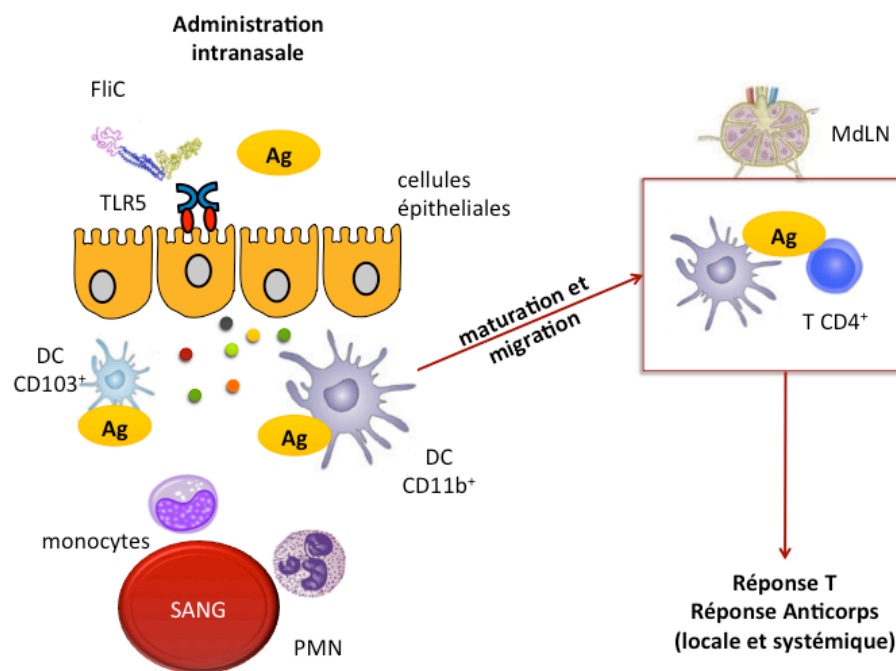
### 3 Article 2 : L'activation TLR5-indépendante des DC conventionnelles pulmonaires est responsable de l'effet adjuvant muqueux de la flagelline

#### 3.1 INTRODUCTION

L'effet adjuvant muqueux de la flagelline est lié à l'activation TLR5 dans les cellules épithéliales respiratoires mais les mécanismes cellulaires et moléculaires restent encore à préciser (**Article 1**). Les modifications cellulaires et moléculaires induites par des adjuvants tels que MF59, AS03 ou alum ont été étudiées dans des modèles de vaccination systémique. Ces études ont mis en avant un recrutement significatif de cellules de l'immunité innée au point d'injection, en particulier des PMN et des monocytes inflammatoires. Cependant l'implication de ces cellules innées dans l'induction ou la modulation de l'effet adjuvant n'a pas été précisée. De plus, des analyses de type "microarrays" ont révélé une signature commune des adjuvants MF59, alum et CpG par voie intramusculaire. Ces 3 adjuvants activent la transcription de gènes participant aux interactions des cytokines avec leur récepteur, à la réponse hôte-pathogène, la réponse aux interférons de type I ainsi qu'à la défense anti-microbienne (Mosca, 2008). Dans notre étude, nous avons donc analysé le recrutement cellulaire induit par la flagelline dans la muqueuse respiratoire. Il était déjà connu que la flagelline stimule un recrutement rapide et important de PMN permettant la clairance de microorganismes pathogènes tels que *Streptococcus pneumoniae* ou *Pseudomonas aeruginosa* au niveau du parenchyme pulmonaire et de la lumière alvéolaire (Honko, 2004; Munoz, 2010; Yu, 2010). Cependant l'influence des PMN sur l'effet adjuvant de la flagelline, de même que le recrutement d'autres cellules de l'immunité innée, restent peu connus dans ce contexte. Au vu des études précédemment mentionnées sur les adjuvants systémiques, nous avons étudié le recrutement local de PMN, monocytes inflammatoires et de DC (cDC et moDC). De même leur capacité à capturer l'antigène et à migrer dans les ganglions drainants a été analysée. Nous avons montré que les PMN et monocytes inflammatoires sont recrutés en nombre dans la muqueuse pulmonaire, mais ne sont pas essentiels à l'effet adjuvant puisque leur déplétion ou leur absence ne l'abroge pas. A l'inverse, nos travaux indiquent que les cDC (CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>high</sup>CD24<sup>+</sup>CD64<sup>neg</sup>) sont activées localement, capturent efficacement l'antigène et migrent dans les ganglions drainants où elles sont alors capables de présenter l'antigène aux lymphocytes T CD4. Dans nos conditions expérimentales, les cDC CD11b<sup>+</sup> ont été identifiées comme les plus efficaces dans la présentation aux lymphocytes T CD4. De plus l'utilisation d'un modèle de souris transgénique *Cd11c-DTR* a montré une abrogation de la réponse T en l'absence de DC.

Dans un second temps nous avons cherché les mécanismes d'activation des cDC pulmonaires par la flagelline. Conformément à ce que nous avons observé pour la réponse

adaptative, nous avons démontré que l'expression de TLR5 par les cellules hématopoïétiques, en particulier les cDC, n'est pas requise pour leur activation par la flagelline. Cette activation indépendante de TLR5 des DC pulmonaires par la flagelline a été montrée dans des souris chimères  $Tlr5^{-/-} \rightarrow WT$ , où seules les cellules stromales sont capables d'être activées directement par la flagelline. A l'inverse, par voie systémique (i.p.) il est remarquable que seule la stimulation directe de TLR5 par la flagelline permette l'activation de DC spléniques. Ces résultats nous ont poussé à rechercher des médiateurs inflammatoires d'origine épithéliale pouvant transactiver les cDC pulmonaires (**Figure 30**). Cette recherche a été basée sur l'analyse microarrays des gènes induits par la flagelline dans le poumon total ainsi que dans des cellules épithéliales pulmonaires murines et humaines. Dans la littérature, les cytokines telles que TSLP, IL-25 ou les cytokines de la famille de l'IL-1 ont été décrites comme activant les DC pulmonaires. Cependant leur rôle dans l'effet adjuvant muqueux de la flagelline semble peu probable car la transcription des gènes codants pour ces médiateurs est peu activée par la flagelline. L'identification des médiateurs épithéliaux impliqués dans la transactivation des cDC reste donc incomplète et devra notamment s'appuyer sur la mise en place d'un modèle de culture *in vitro* de cellules primaires bronchiques et de cDC.



**Figure 30: Modèle de contribution des cDC à l'effet adjuvant de la flagelline dans la muqueuse pulmonaire**

La stimulation TLR5 dépendante de l'épithélium pulmonaire provoque une infiltration de PMN et monocytes inflammatoires ainsi que l'activation de cDC résidentes. Ces cDC CD11b<sup>+</sup> et CD103<sup>+</sup> capturent très efficacement les antigènes et migrent dans les ganglions drainants (ganglions médiastinaux ou MdLN). A ce niveau la présentation antigénique par ces DC migratoires matures stimule la réponse T CD4<sup>+</sup> et la réponse en anticorps. A l'état basal, les PMN et monocytes sont majoritairement retrouvés dans la vasculature pulmonaire mais infiltrent le parenchyme suite à l'activation par la flagelline. Comparativement aux DC qui sont insérées dans l'épithélium pulmonaire, leur capacité à capturer l'antigène est moindre. De plus, la déplétion des PMN et/ou des monocytes n'ayant pas d'impact sur l'effet adjuvant suggère que ces cellules n'ont pas d'activité majeure dans le processus de vaccination intranasale.

## 3.2 ARTICLE 2

Soumis en Octobre 2013 à Journal of Immunology

**TLR5-independent activation of lung conventional dendritic cells promotes the mucosal adjuvant activity of flagellin**

Delphine FOUGERON<sup>\*,†,‡,§</sup>, Laurye VAN MAELE<sup>\*,†,‡,§</sup>, Julien TABAREAU<sup>\*,†,‡,§</sup>, Pascal SONGHET<sup>¶</sup>, Delphine CAYET<sup>\*,†,‡,§</sup>, Nico VAN ROOIJEN<sup>||</sup>, David HOT<sup>\*,†,‡,§</sup>, Hans-Joachim MOLLENKOPF<sup>#</sup>, Wolf-Dietrich HARDT<sup>¶</sup>, Arndt G. BENECKE<sup>\*\*</sup>, and Jean-Claude SIRARD<sup>\*,†,‡,§,††</sup>

\*Institut Pasteur de Lille, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, F-59000 Lille, France; †Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1019, F-59000 Lille, France; ‡Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 8204, F-59000 Lille, France; §Univ Lille Nord de France, F-59000 Lille, France; ¶Institute of Microbiology, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, CH-8093 Zürich, Switzerland; ||Department of Molecular Cell Biology, VU Medical Center, Amsterdam, The Netherlands; #Max Planck Institute for Infection Biology, Berlin, Germany; \*\*Institut des Hautes Études Scientifiques and Centre National de la Recherche Scientifique, F-91440 Bures-sur-Yvette, France;

††Correspondence: Jean-Claude Sirard, e-mail: [jean-claude.sirard@inserm.fr](mailto:jean-claude.sirard@inserm.fr)

# TLR5-independent activation of lung conventional dendritic cells promotes the mucosal adjuvant activity of flagellin

Delphine FOUGERON<sup>\*,†,‡,§</sup>, Laurye VAN MAELE<sup>\*,†,‡,§</sup>, Julien TABAREAU<sup>\*,†,‡,§</sup>, Pascal SONGHET<sup>¶</sup>, Delphine CAYET<sup>\*,†,‡,§</sup>, Nico VAN ROOIJEN<sup>||</sup>, David HOT<sup>\*,†,‡,§</sup>, Hans-Joachim MOLLENKOPF<sup>#</sup>, Wolf-Dietrich HARDT<sup>¶</sup>, Arndt G. Benecke<sup>\*\*</sup>, and Jean-Claude SIRARD<sup>\*,†,‡,§,††</sup>

<sup>\*</sup>Institut Pasteur de Lille, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, F-59000 Lille, France; <sup>†</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1019, F-59000 Lille, France; <sup>‡</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 8204, F-59000 Lille, France; <sup>§</sup>Univ Lille Nord de France, F-59000 Lille, France; <sup>¶</sup>Institute of Microbiology, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, CH-8093 Zürich, Switzerland; <sup>||</sup>Department of Molecular Cell Biology, VU Medical Center, Amsterdam, The Netherlands; <sup>#</sup>Max Planck Institute for Infection Biology, Berlin, Germany; <sup>\*\*</sup>Institut des Hautes Études Scientifiques and Centre National de la Recherche Scientifique, F-91440 Bures-sur-Yvette, France;

**The present study sought to identify the antigen presenting cells involved in adjuvant activity following the intranasal administration of the Toll-like receptor 5 agonist flagellin. We used molecular profiling to show that cytokine/chemokine and dendritic cell maturation pathways are surrogate signatures for flagellin activation in the lung. Neutrophils and inflammatory monocytes were massively recruited to the lungs but were not essential for the adjuvant activity. In contrast, flagellin signaling did not induce a significant recruitment of conventional dendritic cells but enhanced their maturation and migration to the lymph nodes. In particular, CD11b<sup>+</sup> migratory dendritic cells were essential for induction of a CD4<sup>+</sup> T-cell response. The functional activation of dendritic cells was independent of direct signaling via Toll-like receptor 5 or the IL-1 cytokines. Our results demonstrated that migratory CD11b<sup>+</sup> dendritic cells are essential components in flagellin's mucosal adjuvant effect. Furthermore, the observation that flagellin's adjuvant activity can be dissociated from inflammatory cell recruitment opens up new perspectives for vaccine improvement.**

## Introduction

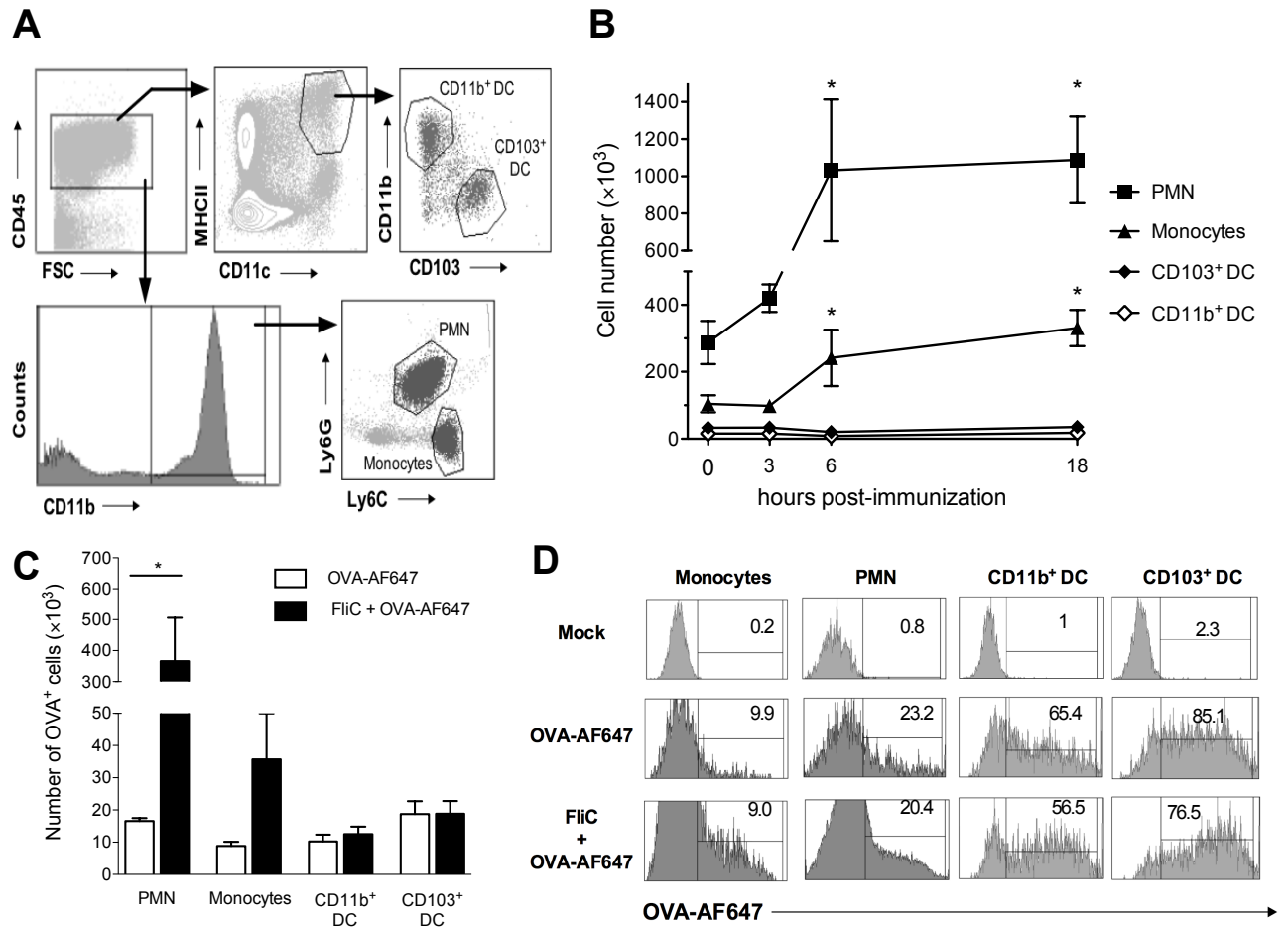
Many pathogens of public health concern (including the influenza and respiratory syncytial viruses, and bacteria such as *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*) enter the body via the respiratory tract in general and the lung mucosa in particular. Mucosal vaccines induce a local adaptive immune response (i.e. secretory antibodies and specific T cells) and constitute a unique means of directly preventing these infections (1). Most vaccines are delivered systemically and use systemic adjuvants. Although the few commercially available mucosal vaccines are generally effective, mucosal adjuvant candidates have not demonstrated sufficient levels of potency and safety.

In recent years, researchers have sought to understand the mechanisms of action of vaccine adjuvants by performing dynamic analyses with microarrays, high-throughput cytokine assays and cell phenotyping (2). In particular, the immunomodulatory functions of adjuvants appear to mimic activation of the immune system by live microorganisms and thereby promote appropriate memory responses to infections (3, 4). A common feature in immunomodulation is the transient induction of a pro-inflammatory immune response (3, 5-7). Thus, the administration of adjuvant is associated with the production of cytokines and chemokines (such as IL-6, IL-1 $\beta$ , CCL2, CXCL1 and CXCL8) and the concomitant recruitment of innate immune cells and antigen-presenting cells (APCs). Thus, the oil-in-water emulsion MF59 and alum-based adjuvants trigger the infiltration of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) at the injection site and the recruitment of APCs (i.e. inflammatory monocytes and/or dendritic cells (DCs))

(5, 8-10). In addition to the stimulation of cell recruitment, an optimal adjuvant has to induce the functional maturation of APCs (5, 10). Monocytes and DCs are known to be the "professional APCs" that drive this adjuvant activity (11).

In non-lymphoid tissue (such as lung) and at steady state, one can distinguish between CD11b<sup>+</sup> and CD103<sup>+</sup> conventional DCs (cDCs). These cells originate from a pre-DC blood precursor and serve as sentinels (12). Conventional DCs are characterized by the expression of specific markers, including CD11c, MHCII, CD24 and Zbtb46 (12, 13). The CD11b<sup>+</sup> cDCs are mainly associated with the ability to trigger Th2 immunity, whereas CD103<sup>+</sup> cDCs rather promote Th1/Th17 responses and cross-presentation (14-17).

Upon vaccination or infection, inflammatory monocytes that have entered tissues via a CCR2-dependent process can also differentiate into DCs (11, 18). Monocyte-derived DCs (MoDCs) express not only the usual DC markers (such as CD11c, MHCII and CD11b) but also the specific monocyte/macrophage marker CD64. They lack CD24, however (17, 19). Depending on the nature of the adjuvant or the inflammatory injury, MoDCs elicit Th1, Th2 or Th17 responses and CD8 responses (9, 10, 20). It has been shown that MoDCs contribute to the activity of various adjuvants (5, 8, 10). Although both monocytes and cDCs can trigger T and B cell responses, their contribution to the activity of mucosal adjuvants has yet to be determined. Innate receptors (such as the Toll-like receptors (TLRs)) are essential for the activation of adaptive immunity by cDCs and MoDCs. Flagellins (bacterial proteins that are components of the flagellum) are detected by TLR5, which in turn drives adjuvant activity via systemic and mucosal immunization routes (21). When delivered by systemic administration, flagellin directly stimulates the maturation of DCs and thus activates T cell responses (22-24).



**Fig. 1. Analysis of the recruitment and antigen uptake by lung neutrophils, monocytes and conventional dendritic cells.** C57BL/6 mice ( $n=4$ ) were treated i.n. with fluorescent ovalbumin (OVA)-AF647 in the presence or absence of flagellin (FliC). Lung tissue samples were collected at the indicated time points for flow cytometry analysis. (A) Gating strategy for lung CD45<sup>+</sup> immune cells. Absolute counts of total (B) and OVA-positive (C) PMNs, monocytes, CD11b<sup>+</sup> DCs and CD103<sup>+</sup> DCs 6 h after immunization. (D) Representative histograms of antigen uptake by cell type. The numbers indicate the OVA<sup>+</sup> cell count as a percentage of the total population considered. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM and are representative of four experiments (\*  $p < 0.05$ ).

Recently, we discovered that adaptive immune responses stimulated by i.n. flagellin required TLR5 signaling in the airway epithelial cells (25). Thus, direct TLR5 signaling in the hematopoietic cells was not mandatory for the mucosal adjuvant effect of flagellin. We also showed that flagellin mucosal adjuvant activity was independent of NLR family CARD domain-containing protein 4 (NLRC4), i.e. inflammasome activation (25). Nevertheless, the exact nature of the APCs involved in flagellin's mucosal adjuvant activity and the mechanisms underlying the functional maturation of these APCs remain to be determined. Hence, the present study sought to characterize the nature of cells that infiltrate lung tissue upon i.n. flagellin administration. We established that flagellin enhanced the functional maturation of lung CD11b<sup>+</sup> cDCs and their migration to the mediastinal lymph nodes (MdLNs), independently of direct TLR5 signaling.

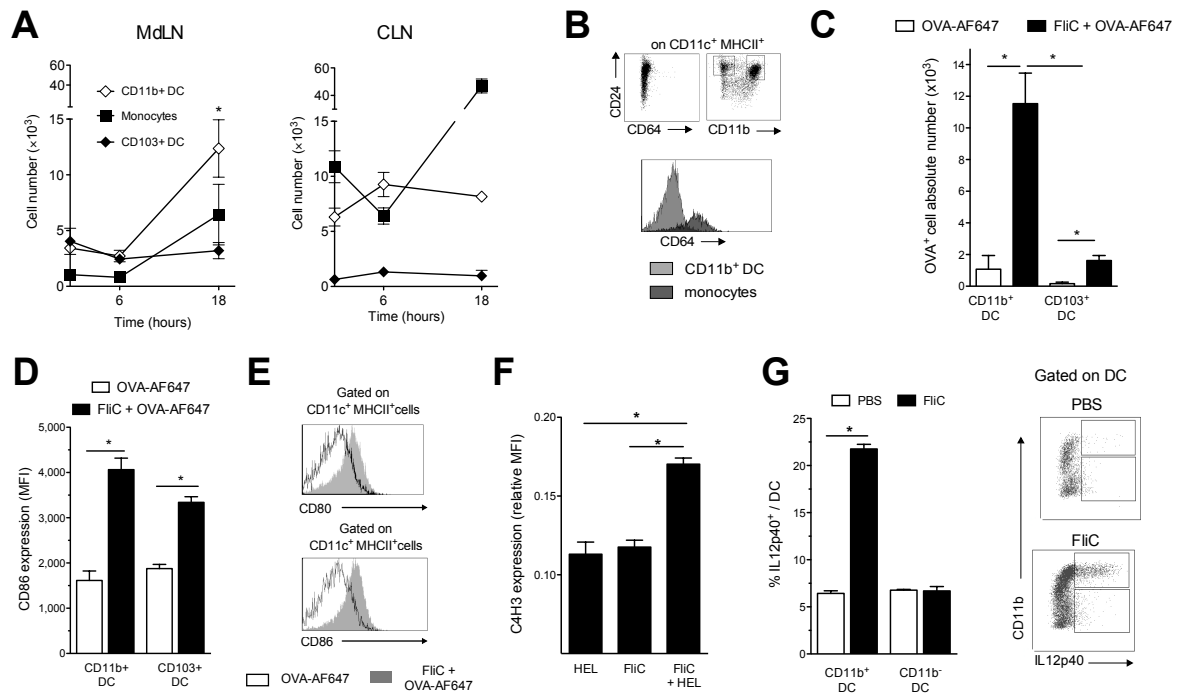
## Results

### Flagellin activates a transcriptional program for phagocyte recruitment and activation.

In order to dissect flagellin's mode of action as a mucosal adjuvant, we analyzed transcriptional changes over time in lung tissue (Supplemental Fig. 1). The flagellin-mediated response was associated with strong activation of gene expression at 2h and 4h and was tightly regulated, since many genes had reverted

to steady-state expression levels at 18h (Supplemental Fig. 1A). Ingenuity Pathway Analysis (IPA) highlighted an overrepresentation of canonical pathways related to pro-inflammatory responses such as NF- $\kappa$ B, IL-6, interferon, and acute phase response signaling (Supplemental Fig. 1B). Interestingly, chemokines specific for APCs (i.e. DCs (CCL20), monocytes (CCL2) and innate immune cells, i.e. PMNs (CXCL1/CXCL2)) were swiftly activated. In agreement with the chemokine profile, biological functions linked to cell movement, the number and the activity of phagocytes, and leukocyte/APC function were most significantly upregulated by flagellin treatment (Supplemental Fig. 1C). Markedly, similar gene expression patterns were observed for blood cells (Supplemental Fig. 1E-F). Using the ImmGen database, we found that expression levels of genes specific for PMN (such as *Fpr1*, *Lcn2*, *Ccl3*, *Irg1* and *S100a8*) and the monocyte/macrophage lineage (such as *Cx3cr1*, *Ccr2*, *Msr1*, *Csf1r*, *Cd14* and *Fcgr1*) were significantly increased (Supplemental Fig. 1). In contrast, few genes of the core DC signature (such as *Zbtb46*, *Flt3* and *Ass1* (13)) were differentially expressed although the DC maturation pathway and the biological functions related to antigen processing and presentation were upregulated. In summary, the observed microarray signatures support the hypothesis whereby flagellin's mucosal adjuvant activity is driven by local innate signals leading to the activation/recruitment of APCs (such as DCs).





**Fig. 2. Flagellin elicits the maturation and migration of lung conventional dendritic cells to mediastinal lymph nodes.** C57BL/6 or C3H/HeN mice (n=3-4) were immunized i.n. with ovalbumin (OVA)-AF647 ± flagellin (FliC) (A-E), hen egg lysozyme (HEL) ± FliC (F) or PBS ± FliC (G). Lymph nodes were sampled at the indicated times for flow cytometry analysis. Dendritic cells were defined as CD45<sup>+</sup> Lin<sup>neg</sup> CD11c<sup>+</sup> MHCII<sup>+</sup> cells, and monocytes as CD45<sup>+</sup> Lin<sup>neg</sup> CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup>. (A) Time course of DC and monocytes recruitment in the MdlNs and CLNs. (B) CD24 and CD64 expression in migratory DC and monocytes in MdlNs 18h after administration. Plots represent the expression of CD24 and CD64 on total, CD11b<sup>+</sup> or CD103<sup>+</sup> DC. Histogram shows CD64 expression on CD11b<sup>+</sup> DC and monocytes. (C) Absolute numbers of antigen-positive migratory DC populations and (D) CD86 expression in MdlNs 18h after immunization. (E) Representative histograms of CD80 and CD86 expression by the indicated population in the MdlNs. (F) Antigen presentation by MdlN DCs was assessed with C4H3 antibody 18h after immunization in C3H/HeN mice (C4H3 detects HEL peptide loaded on I-A<sup>b</sup>). Fluorescence of the C4H3 antibody was normalized against the I-A<sup>b</sup> fluorescence. (G) Percentage of IL12p40-producing CD11b<sup>+</sup> and CD103<sup>+</sup> DC among the total population and representative dot plots. Results are expressed as the mean ± SEM and are representative of 1-4 experiments (\* p < 0.05)

### Monocytes and neutrophils are recruited to lungs but are not involved in mucosal adjuvant activity of flagellin

We next investigated the change over time in counts of lung monocytes, DCs, and PMNs after the i.n. administration of flagellin. Among CD45<sup>+</sup> lung cells, the following cell types were identified: monocytes/macrophages (CD11b<sup>high</sup> Ly6C<sup>high</sup> Ly6G<sup>neg</sup> CCR2<sup>+</sup>), DCs (CD11c<sup>+</sup> MHCII<sup>high</sup> CD11b<sup>+</sup> or CD11c<sup>+</sup> MHCII<sup>high</sup> CD103<sup>+</sup>) and PMNs (CD11b<sup>high</sup> Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup>) (Fig. 1A). Our experiment revealed that the recruitment of PMNs started rapidly (as early as 3h post-instillation) and peaked at 6h, as described previously (28-31) (Fig. 1B). The infiltration of PMNs into lungs was correlated with a concomitant increase in the PMN count in the blood (Supplemental Fig. 1). Monocytes were also recruited by flagellin treatment. In contrast, we did not observe any significant changes in the numbers of lung CD11b<sup>+</sup> or CD103<sup>+</sup> DCs (Fig. 1B). Interestingly, analysis of lung CD11b<sup>+</sup> DC revealed that neither cDC (CD24<sup>+</sup>) nor moDC (CD64<sup>+</sup>) are significantly increased within the first 18h after flagellin treatment (data not shown). We assessed the potential contribution of infiltrating monocytes or PMNs to flagellin's adjuvant activity by performing experiments with clodronate liposomes, *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice and Ly6G-specific depleting antibodies (Supplemental Fig. 2). Animals depleted or deficient in PMNs or monocytes responded in much the same way as control animals did to i.n. immunization - suggesting that the recruitment of monocytes and PMNs does not regulate the intrinsic adjuvant activity of DCs.

### Dendritic cells capture antigen in the airways independently of flagellin stimulation

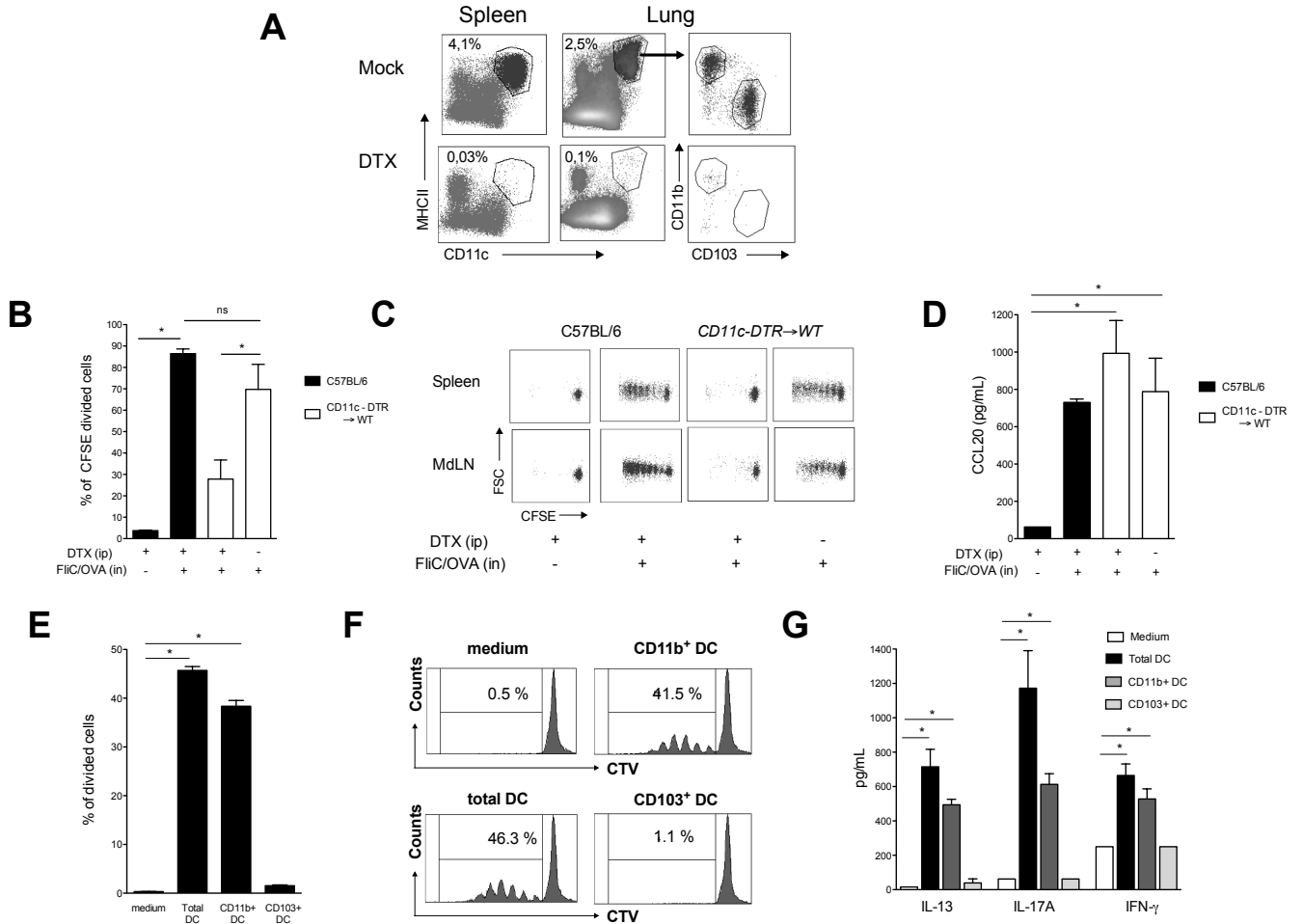
In order to label and track the cells that had captured the antigen in the mucosa, fluorescent ovalbumin (OVA-AF647) ± flagellin was administered intranasally for 6h. The counts of monocyte and PMN bound to OVA respectively increased >3-fold and >20-fold, whereas the CD11b<sup>+</sup> and CD103<sup>+</sup> DC counts did not change significantly after flagellin treatment (Fig. 1C). Furthermore, we found that >55% of CD11b<sup>+</sup> DCs, >75%

of CD103<sup>+</sup> DCs, 20% of PMNs and 10% of monocytes were bound to OVA, regardless to flagellin administration (Fig. 1D). We next investigated the localization of APCs and PMNs within the respiratory tract by administering an intravenous pulse of CD45-specific antibody before the tissue sampling (Supplemental Fig. 3A-B). As described previously, this approach discriminates between hematopoietic cells present in the tissue vasculature (i.e. marginated cells) and those residing in the tissue parenchyma (32). At steady state, PMNs and monocytes were mostly marginated and DCs were mostly interstitial. This observation fits with the literature data on lung DCs; the latter have been found to surround large blood vessels and conducting airways (33). After flagellin administration, only PMNs infiltrated the lung to a significant extent. Like the interstitial DCs, the interstitial PMNs were strongly bound to OVA and thus suggested a correlation between an interstitial location and antigen capture. In accordance with this observation, the PMNs were mainly found in the bronchoalveolar compartment. Taken as a whole, these data suggest that lung DCs have a key role in antigen capture upon i.n. immunization.

### The recruitment of DCs into draining lymph nodes is associated with antigen presentation

Since DCs from control and flagellin-immunized animals had displayed similarly effective antigen capture in the lung, we next assessed DC activation (Fig. 2 and Supplemental Fig. 3C-D). In the lung, both CD11b<sup>+</sup> and CD103<sup>+</sup> DCs upregulated the expression of MHCII and the co-stimulatory molecules CD86 and CD80. These observations were strengthened by the IPA analysis, which identified an enrichment of genes related to the dendritic cell maturation pathway and antigen presentation (Supplemental Fig. 1). Hence, our data show that flagellin stimulates the functional activation of lung DCs.

The MdlNs that drain the lung are known to be a major site for the induction of T cell-mediated immunity following i.n. flagellin administration (34). We therefore looked at whether lung DCs migrated to MdlNs (Fig. 2A). In contrast to the results for the lung, significant changes in CD11b<sup>+</sup> DC counts and (to a



**Fig. 3. CD11b<sup>+</sup> dendritic cells are essential for flagellin's mucosal adjuvant activity.** (A-C) C57BL/6 (WT) and *Cd11c-DTR* > WT chimera mice (n=3-4) were treated i.p. with PBS or DTX (600 ng at 0h and 200 ng at 24h) and analyzed at 48h. (A) Representative plots of DC depletion in the spleen and lung. Numbers indicate the DC as percentage of CD45<sup>+</sup> cells. (B-C) Impairment of the T cell response by DC depletion. Mice were adoptively transferred with CFSE-labelled ovalbumin (OVA)-specific OT-II CD4<sup>+</sup> T cells and i.n. immunized 24h later with PBS or OVA+flagellin (FliC). The proliferation of OT-II cell was analyzed 5 days after immunization in the spleen and the MdLNs (B). Plots represent the CFSE fluorescence of CD4<sup>+</sup> V $\alpha$ 2<sup>+</sup> OT-II cells and are representative of two experiments (C). (D) The innate immune response to flagellin after DC depletion. Serum CCL20 production was measured by ELISA 6h after the i.n. administration of flagellin. (E-G) C57BL/6 mice (n=16) were immunized i.n. with OVA+flagellin and the MdLN were sampled and pooled 18h later. Dendritic cells (CD45<sup>+</sup> Lin<sup>neg</sup> CD11c<sup>+</sup> MHCII<sup>+</sup>) were sorted as the total population and CD11b<sup>+</sup> and CD103<sup>+</sup> subsets. Dendritic cells (5 $\times$ 10<sup>4</sup>) were cultured with CTV-labelled OT-II cells (5 $\times$ 10<sup>5</sup>) for 5 days. (E) T cell proliferation. Values indicate the number of divided OT-II cells as a percentage of all OT-II cells. (F) Representative histograms of CTV dilution. (G) Cytokine production in the supernatants. The results are representative of three experiments (\* p < 0.05).

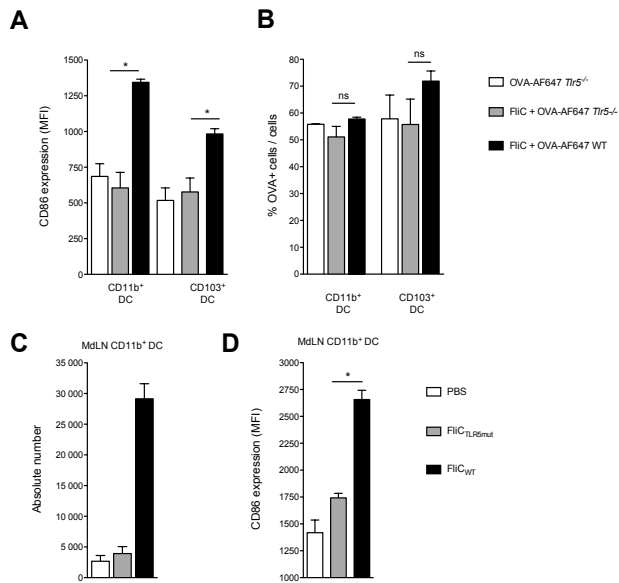
lesser extent) CD103<sup>+</sup> DC counts in the MdLNs were observed after i.n. administration of flagellin. Importantly, this recruitment was not detected in the cervical lymph nodes (CLNs) draining the nasal cavity (Fig. 2A). Furthermore, we established that these DCs were cDCs but not MoDCs, given their expression of CD24 and their lack of CD64 expression (Fig. 2B). These observations are consistent with the maintenance of the adjuvant effect of flagellin in *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice that are deficient for the recruitment of monocytes and MoDCs (15).

We next tracked DCs that had captured fluorescent OVA in the lung and then migrated to MdLNs. When flagellin was co-administered, the number of OVA-associated CD11b<sup>+</sup> DCs in MdLNs was particularly elevated, as was the cells' expression of the co-stimulatory molecules CD86 and CD80 (Fig. 2C-E). In absence of flagellin, the low number of OVA-associated DC were consistent with a minor role of passive diffusion of OVA to the MdLN. To establish whether the DCs had indeed processed and presented the antigen, we performed experiments with hen egg lysozyme (HEL) and the C4H3 antibody that recognizes the HEL<sub>46-61</sub> peptide loaded on MHCII (I-A<sup>k</sup>) (22, 27). To quantify

antigen presentation, the C4H3 signal was normalized against the I-A<sup>k</sup> signal. Intranasal administration of flagellin and HEL was associated with a significantly higher C4H3/I-A<sup>k</sup> ratio in MdLN DCs (relative to HEL treatment alone) (Fig. 2F). Lastly, MdLN DCs were shown to produce the T-cell activating cytokine IL12p40 (Fig. 2G). Overall, these results suggest that (i) flagellin signaling enhances the migration of CD11b<sup>+</sup> cDCs from the lung to the MdLNs and (ii) these migratory cDCs contribute to the adjuvant effect.

#### Lung CD11b<sup>+</sup> cDCs are crucial for the flagellin-mediated adjuvant effect

To ascertain the role of cDCs in the flagellin-dependent mucosal adjuvant effect, we performed experiments with *Cd11c-DTR* mice. The initial experiments using 100 ng of diphtheria toxin (DTX) indicated a partial depletion of CD11b<sup>+</sup> DCs in the lung. To circumvent this, *Cd11c-DTR* bone marrow chimera were generated and injected twice with high doses of DTX, in order to eliminate all the lung DCs (Fig. 3A). Proliferation of passively transferred, OVA-specific CD4<sup>+</sup> lymphocytes (OT-II) was monitored as a guide to adjuvant activity. Intranasal immunization



**Fig. 4. Airway dendritic cell maturation and migration require TLR5 signaling.** *Tlr5*<sup>-/-</sup> and/or C57BL/6 WT mice (n=3-4) were immunized i.n. with ovalbumin (OVA)-AF647 ± flagellin (FliC) (A-B). Lungs were sampled 6h later. (A) DC functional activation (CD86 expression) in *Tlr5*<sup>-/-</sup> and WT mice. OVA uptake by DC was analyzed (B). (C) C57BL/6 mice (n=3-4) were immunized i.n. with flagellin (FliC<sub>WT</sub>) or FliC<sub>TLR5mut</sub> (mutated for the TLR5 signaling motif 89-

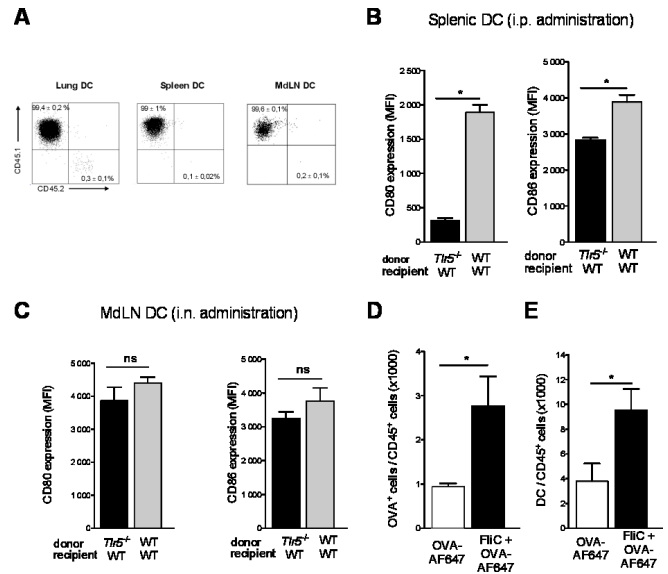
with flagellin (FliC<sub>WT</sub>) or FliC<sub>TLR5mut</sub> (mutated for the TLR5 signaling motif 89- were analyzed 18h after immunization. Data represent the mean ± SEM (\*p<0.05).

with flagellin and OVA stimulated the proliferation of OT-II cells both in the spleen and MdLNs from control animals and *Cd11c-DTR* chimera animals. However, DTX treatment of *Cd11c-DTR* mice prior to i.n. immunization abrogated both the local and systemic proliferation of the OT-II cells (Fig. 3B-C). This effect was not related to another effect of DTX, since C57BL/6 animals treated with the toxin were fully responsive. Interestingly, DC depletion did not impact on the flagellin-mediated lung response, as assessed by production of the chemokine CCL20 (Fig. 3D). Taken as a whole, these data strongly suggest that mucosal cDCs are essential for the adjuvant activity of i.n. flagellin.

The cDCs' ability to present antigen was further analyzed *in vitro* (Fig. 3E-G). Total, CD11b<sup>+</sup> and CD103<sup>+</sup> DCs were sorted from the MdLNs of animals immunized with flagellin and OVA and cultured with CTV-labeled OT-II CD4<sup>+</sup> lymphocytes. We found that CD11b<sup>+</sup> DCs efficiently activated OT-II cells and thus prompted them to proliferate and secrete the cytokines IFN $\gamma$ , IL-13, and IL-17. In contrast, CD103<sup>+</sup> DCs hardly stimulated proliferation or cytokine production. These data reinforced the hypothesis whereby migratory CD11b<sup>+</sup> cDCs have a key role in the flagellin's adjuvant activity.

#### TLR5 signaling in mucosal DCs is not required for the cells' functional activation

We next addressed the contribution of TLR5 signaling for cDC activation and migration using *Tlr5*<sup>-/-</sup> mice and mutant flagellin (FliC<sub>TLR5mut</sub>) (Fig. 4). Furthermore, we did not detect any activation of lung cDCs although cDC of *Tlr5*<sup>-/-</sup> mice captured OVA similarly to cells of WT animals (Fig. 4A-B). Similarly FliC<sub>TLR5mut</sub> (flagellin mutated in the TLR5 signaling motif) did not induce either the migration or the maturation of cDCs in the MdLNs (Fig. 4C-D). These data are in agreement with the lack of mucosal adjuvant activity in *Tlr5*<sup>-/-</sup> mice or mice immunized i.n. with FliC<sub>TLR5mut</sub> (data not shown) (25).



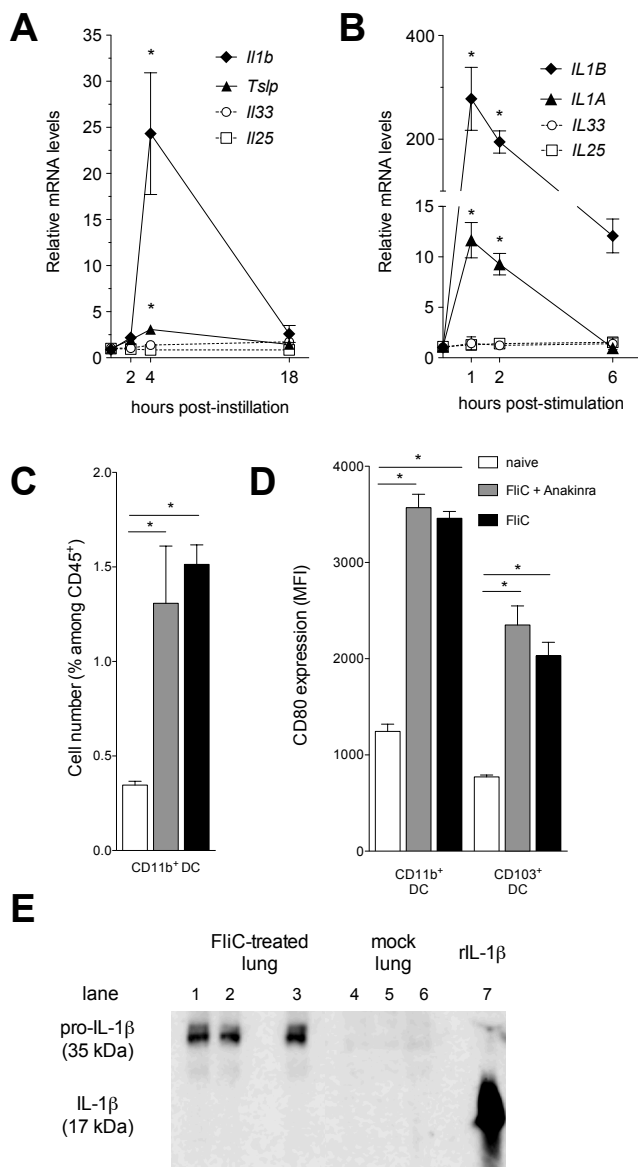
**Fig. 5. TLR5 signaling in airway dendritic cell is not required for maturation and migration in response to i.n. flagellin.** WT>WT and *Tlr5*<sup>-/-</sup>>WT chimera mice were generated by bone-marrow injection into lethally irradiated recipient animals. Three months after engraftment, mice (n=3-4) were immunized i.p. or i.n. with flagellin (FliC). (A) Representative plots of DC reconstitution. Levels of engraftment were assessed in the lung, spleen and MdLN of Ly5.1>Ly5.2 chimeric mice. (B) Splenic DC functional maturation.

was assessed in WT>WT and *Tlr5*<sup>-/-</sup>>WT chimera mice 18h after i.p. flagellin administration. (C) The activation of DCs was evaluated in MdLNs 18h after i.n. flagellin administration. *Tlr5*<sup>-/-</sup>>WT animals (n=4) were immunized i.n. with ovalbumin (OVA)-AF647 ± flagellin (2  $\mu$ g). The percentage of OVA<sup>+</sup> cells (D) and migratory DCs (E) in the MdLN was determined to assess flagellin activity. Data represent the mean ± SEM and are representative of two experiments (\*p<0.05).

We had previously observed that TLR5 signaling in radioresistant airway epithelial cells but not in the hematopoietic cells was essential for the immune responses induced by intranasal flagellin (25). In order to determine whether lung cDC activation and migration to the MdLN are independent of TLR5 signaling in the hematopoietic compartment, we generated *Tlr5*<sup>-/-</sup>>WT and WT > WT chimeric mice. Reconstitution of the DC compartment was found to be >98% in lungs and MdLN as well as in spleen (Fig. 5A). As described by previous reports (22, 25, 35, 36), splenic DCs from *Tlr5*<sup>-/-</sup>>WT animals were unable to respond to stimulation by i.p. flagellin in contrast to WT > WT (Fig. 5B). These data highlighted that systemic DC activation require direct TLR5 signaling. In contrast, when flagellin activity was assessed after i.n. administration, MdLN DCs from both *Tlr5*<sup>-/-</sup>>WT and WT > WT mice were activated as demonstrated by the upregulation of the co-stimulatory markers CD80 and CD86 (Fig. 5C). Moreover, i.n. flagellin enhanced the amount of OVA-loaded cells and migratory DC in the MdLN of *Tlr5*<sup>-/-</sup>>WT animals (Fig. 5D-E). Therefore, in contrast to systemic vaccination, delivery of flagellin by nasal route impacts the activation of cDCs in a process that is independent of direct TLR5 signaling. These data support that factors derived from TLR5 signaling in the airway epithelial cells promote the transactivation of DC.

#### Maturation and migration of cDC is not controlled by IL-1 cytokines

We next sought factors from airway epithelial cells responsible for DC transactivation. We focused on the cytokines IL-25, TSLP, IL-33, IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  that have been described as DC activating signals (37, 38). Remarkably the expression of genes encoding the cytokines IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  was upregulated in lung upon nasal instillation of flagellin although the expression



**Fig. 6. IL-1 derived cytokines are up-regulated by flagellin but do not mediate dendritic cell maturation**(A) C57BL/6 mice (n=3 per group) were treated i.n. with flagellin (FliC) for 2h, 4h and 18h. Total lung RNA was processed for qRT-PCR. (B) Normal bronchial epithelial cell line BEAS-2B were stimulated 1h, 2h or 6h with flagellin. Total RNA was extracted and gene expression analyzed by qRT-PCR. Levels of mRNA in mock animals or cells were arbitrarily set to 1 and used to calculate relative gene expression of flagellin-treated animals or cells. (C, D) C57BL/6 mice (n=3-4) were treated i.n. with PBS or rIL-1ra (Anakinra, 150 $\mu$ g). Seven hours later, PBS or flagellin (FliC) were administered i.n.. Migration (C) and functional activation (D) of DC in the MdLN were analyzed 18h after immunization. (E) WT mice (n=3) were immunized i.n. with FliC or left untreated. Lung tissue samples were collected after 6 hours and IL-1 $\beta$  was detected by immunoblot on tissue homogenates. Each lane corresponds to individual mice and recombinant IL-1 $\beta$  (rIL-1 $\beta$ , lane 7) was used as a positive control. Data are representative of 2-3 experiments and are expressed as the mean  $\pm$  SEM (\*p<0.05).

pattern for IL-25, TSLP, IL-33 was unchanged (Fig. 6A). Similarly, activation of human or mouse airway epithelial cells by

flagellin specifically upregulated transcription of genes coding IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  (Fig. 6B and data not shown). Since expression of IL-25, IL-33 and TSLP was not differentially regulated by flagellin stimulation, our data strongly suggested that IL-25, IL-33 and TSLP are not crucial for cDC maturation and migration. We therefore studied the contribution of IL-1 $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ . Treatment of wild type animals with recombinant IL-1R antagonist (Anakinra) prior nasal immunization did not prevent cDC maturation and migration (Fig. 6C-D). We also observed that pro-IL-1 $\beta$  was not processed into mature IL-1 $\beta$  in the lung tissues (Fig. 6E). Altogether these data support the idea that IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  did not contribute to functional transactivation of cDC by i.n. flagellin.

## Discussion

The development of novel prophylactic strategies requires knowledge of the APCs involved in inducing adaptive immunity in a context of infection or vaccination. Our present results demonstrate for the first time that the i.n. adjuvant activity of the TLR5 agonist flagellin depends on the functional activation of lung CD11b<sup>+</sup> cDCs. The lung tissue's transcriptional signature notably highlighted the DC maturation pathway. Although flagellin-dependent signaling does not stimulate significant infiltration of CD11b<sup>+</sup> cDCs, it does enhance their ability to process and present antigen and to migrate to draining lymph nodes. Furthermore, cDC activation does not involve direct TLR5 signaling within cDCs. Lastly, our data suggest that cDC transactivation does not rely on IL-25, TSLP, IL-33, IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$ .

The transcriptional signature induced by flagellin shares many features of those induced by various systemic or mucosal adjuvants at the administration site (5-7, 16). The fact that adjuvants generally upregulate the biological pathways related to acute phase response and chemokine signaling highlights the recruitment of inflammatory immune cells. Polymorphonuclear neutrophils are strongly recruited in response to flagellin and the process is linked to the production of chemokines by the epithelial TLR5 signaling pathway (29, 30). Infiltration of the injection site and the draining lymph nodes by PMNs is known to be increased by other adjuvants (regardless of whether they are TLR agonists or not) (39, 40). In the setting of an inflammatory response, PMNs may play a role in the regulation of adaptive immunity because they produce cytokines that further promote APC activation (41). However, our data indicated that PMNs are not essential for the induction or regulation of flagellin's adjuvant activity (as has also been observed for the adjuvant MF59 (39)).

Our molecular and cellular analyses indicated that another main feature of i.n. flagellin administration was the recruitment of monocytes into lung tissue. Our results in CCR2-deficient animals and in clodronate liposome depletion experiments strongly suggest that monocytes and MoDCs are not required for flagellin-mediated adjuvant activity. Furthermore, the fact that flagellin stimulation was not associated with expression of CD64 on the surface of lung DCs or migratory DCs argues in favor of a cDC phenotype. It is noteworthy that in a murine model of chronic asthma, only high doses of house dust mite antigen stimulated lung MoDC migration to the draining lymph nodes (15). The low doses of antigen used in our study and the transient, moderate inflammation stimulated by flagellin may mean that monocytes do not differentiate into functional MoDCs in this setting. In the lung, the marginated position of monocytes suggests that the latter's primary function is to prevent invasion by inhaled pathogens rather than to migrate to the MdLNs. These physiological features could explain why monocytes do not interfere with cDC activity. Recruitment of PMNs and monocytes appears to be independent of antigen presentation and T cell activation. Taken as a whole, these observations suggest that inflammatory cell recruitment and adjuvant activity can be uncoupled.

Even though flagellin enhances the local production of CCL20, a chemokine associated with DC recruitment (9, 25, 26), we did not find any significant increase of DC number in the respiratory tract, thereby suggesting that CCL20 in this context is unrelated to migration of blood DC precursor towards lung. However, our results demonstrated that during immunization with flagellin adjuvant, lung CD11b<sup>+</sup> cDCs are activated, capture antigen and present it to CD4<sup>+</sup> T cells. Importantly, the counts of activated and antigen-loaded MdLN CD11b<sup>+</sup> cDCs rose during immunization and thus supported the migration of lung cDCs to lymph nodes. Indeed, the flagellin-stimulated migratory APCs expressed the cDC-specific markers CD24 but did not express CD64 (19). We found that both CD11b<sup>+</sup> and CD103<sup>+</sup> lung cDCs could efficiently capture antigen in absence of any stimulation. Interestingly, we and others have established that lung cDCs are mainly interstitial (i.e. subepithelial, parenchymal or perivascular) and are ideally positioned for antigen sampling (42). Our present results indicated that cDCs capture antigen efficiently and as early as 3h after antigen exposure (i.e. prior to the significant parenchymal entry of phagocytes). Consistently, CD11b<sup>+</sup> cDC have also been found to have a key role in the mucosal adjuvant activity of cholera toxin (43).

Knowledge of how cDCs are activated by adjuvant is an important parameter in the development of adjuvants with specific targeting and few side effects. A prominent concept in the induction of adaptive immunity is the direct activation of DCs by pathogens or adjuvants (44). We have previously observed that the mucosal activity of flagellin requires (i) epithelial TLR5 signaling in airways and (ii) the production of immune mediators (25, 30). Taken as a whole, these data strongly suggest that lung CD11b<sup>+</sup> cDCs are activated by signaling in radioresistant cells rather than by direct TLR5 signaling. Interestingly, TLR4-activated epithelial cells mostly induce the DC activation that leads to allergic asthma (45). Moreover, TLR4-activated stromal cells can regulate mucosal T cell responses (46). Stromal cell signaling is critical for the induction of Th2 immunity in response to low doses of LPS. In contrast, higher LPS doses can directly activate hematopoietic cells by eliciting a Th1 response. These observations show that the degree of microbial invasion and/or the strength of the adjuvant can shape the T cell response by targeting various compartments and APCs (4, 47). In contrast to our data on mucosal immunization with flagellin, CD103<sup>+</sup> DCs are directly activated by the systemic delivery of flagellin (23, 48).

Several epithelial factors have been identified as transactivating signals for mucosal DCs (38). In respiratory infection, the IL-1 $\beta$  produced by epithelium is critical for lung-resident cDC activation and CD8 response (37). In our study, although the transcription of *Il1a* and *Il1b* was increased by nasal administration of flagellin, we did not observe any effect of IL-1R signaling inhibition on DC activation. Moreover, pro-IL-1 $\beta$  production was upregulated but processing to mature IL-1 $\beta$  was not observed. Interestingly, these observations correlated with our previous studies showing that NLR4 is not required for mucosal adjuvant effect of flagellin (25). In addition previous works showed that flagellin intranasal adjuvant effect does not depend on TNF $\alpha$ , IL-6, IFN $\alpha$ / $\beta$  or IFN $\gamma$  (49). Other pro-inflammatory epithelial mediators include TSLP, IL-25 and IL-33, which functionally activate lung APCs and promote Th2-biased immunity (38). A recent study suggested that flagellin was a potent activator of TSLP, IL-25 and IL-33 upon nasal flagellin stimulation (34). Since we found that the transcription of genes encoding IL-25, IL-33 and TSLP were not increased in the lung or airway epithelial cells, a major contribution of these cytokines seems rather unlikely. Further investigations will be needed to define the origin of these discrepancies. Recently, the complement protein C3 was found to contribute to the activation of lung DC in the context of flu infection (50). The IL-1 family cytokine IL-36 $\gamma$  is another

candidate for transactivation of DC (51). The contribution of complement-related molecules and IL-36 $\gamma$  which are upregulated in the flagellin-specific signature to lung DC activation remains to be addressed. Finally, it has been reported that CCR7 and CCRL2 are essential for the migration of lung cDCs to MdLNs (52, 53). It is noteworthy that we observed the transient upregulation of *Ccr7* and *Ccr2* expression in lung; this result suggests that the cognate receptors are involved in the migration of cDCs in response to flagellin-mediated adjuvant activity. Defining the nature of DC transactivating factors involved in the adjuvant effect of TLR5 agonist will open unprecedented avenues in the vaccine field.

This model of mucosal immunization constitutes a novel way of characterizing the impact of adjuvants on DC activity. The development of mucosal adjuvants and vaccines requires a detailed understanding of the signals that bypass the tolerogenic imprinting of the mucosa on DCs. Moreover, our study results demonstrated that inflammatory recruitment of immune cells is not essential for adjuvant-mediated immune enhancement. This observation opens up new avenues for designing safer adjuvants with a less intense pro-inflammatory response and fewer side effects.

## Materials and methods

**Mice and reagents.** Six to 10-weeks-old mice (C57BL/6, C3H/HeN, NMRI, as well as *Ccr2*<sup>-/-</sup>, *Tlr5*<sup>-/-</sup>, *Cd11c-DTR*, CD45.1, and OT-II on the C57BL/6 background) were obtained from Janvier, Charles River, Taconic or bred in house. To generate bone marrow (BM) chimeric mice, C57BL/6 mice were lethally irradiated (11 Gray) and intravenously (i.v.) injected with 3-5  $\times 10^6$  BM cells from *Tlr5*<sup>-/-</sup>, *Cd11c-DTR* or CD45.1 mice. After 12-14 weeks, the level of reconstitution was determined by flow cytometry using CD45.1 and CD45.2 markers. Animals were maintained in a specific pathogen-free facility (#A59-350009, Institut Pasteur de Lille) and all experiments complied with national regulations and ethical guidelines. Flagellin (FliC) from *Salmonella Typhimurium*, as well as "FliC<sub>TLR5mut</sub>" (TLR5 signaling motif [QRVRELA] changed in the nonsignaling motif [DTVKVKAT]) were prepared as previously described (26). Endograde ovalbumin (OVA) was purchased from Hyglos, AlexaFluor<sup>®</sup>647 ovalbumin (OVA-AF647) from Molecular Probes<sup>®</sup> and Hen Egg Lysozyme (HEL) from Appligene.

**Immunization and sampling.** Mice were anesthetized by intraperitoneal (i.p.) injection of ketamine-xylazine and immunized intranasally (i.n.) with 20 $\mu$ l of PBS containing (unless otherwise specified) OVA (10 $\mu$ g), OVA-AF647 (10 $\mu$ g) or HEL (800 $\mu$ g)  $\pm$  flagellin (1 $\mu$ g) or CT (1 $\mu$ g). Immunization regimens consisted in prime-boost at day 1 and 21 followed by serum sampling at day 28 for OVA-specific antibody titer determination. For end-point analysis, mice were euthanized by i.p. injection of sodium pentobarbital and perfused lungs, mediastinal lymph nodes (MdLN), cervical lymph nodes (CLN), spleen, or blood cells, were collected. To deplete DC, *Cd11c-DTR*  $\Delta$  CD45.2 WT mice were i.p. injected with 600ng and 200ng diphtheria toxin (DTX) 48h and 24h respectively before i.n. immunization. Depletion efficiencies were determined by flow cytometry in the blood, lung and spleen.

**Flow cytometry.** Single cell suspensions of lung, CLN, MdLN or spleen were obtained by enzymatic digestion with collagenase Ia (1mg/ml, Sigma) and DNase I (40 $\mu$ g/ml, Sigma) for 30 min at 37 $^{\circ}$ C. For lungs, the whole hematopoietic cells were recovered after centrifugation on Percoll 20%. After incubation with anti-CD16/CD32 Fc block antibodies (2.4G2), cells were stained with specific antibodies: CD45 (30F11), CD3 $\epsilon$  (145-2C11), CD19 (1D3), CD4 (RM4-5), V $\alpha$ 2-TCR (B20.1), CD11c (N418), CD24 (M1/69), CD64 (X54-5/7.1), MHCII (M5/114.5.2) specific for I-A<sup>b</sup>/I-E<sup>b</sup> and I-A<sup>k</sup>, CD103 (2E7), CD11b (M1/70), Ly6C (AL21), Ly6G (1A8), CCR2 (475301), CD86 (GL-1), CD80 (16-10A1) (Becton Dickinson, BioLegend and eBioscience). Lineage positive cells were defined by surface expression of CD3 $\epsilon$  and CD19. C4H3-biotinylated antibody was used to detect HEL<sub>46-61</sub> peptide loaded on I-E<sup>k</sup> as previously described (22, 27). Intracellular staining of IL-12 p40 (C15.6) was performed on cell suspensions that were incubated for 3h at 37 $^{\circ}$ C with brefeldin A (1 $\mu$ g/ml, Sigma-Aldrich) using fixation and permeabilization kit from eBioscience reagents. Data were collected on a BD LSR Fortessa and analyzed with BD FACSDiva or Flow Jo softwares. When specified, cells were sorted on a BD FACSAria.

**Adoptive transfer of OT-II CD4 T cells.** CD4 T cells were isolated from lymphoid organs of OT-II mice by negative selection (CD4 isolation kit, Miltenyi Biotec). Purified cells were stained with 5 $\mu$ M of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) or 10 $\mu$ M of CellTrace<sup>™</sup> Violet (CTV) (Invitrogen). 5 $\times 10^6$  purified CD4 T cells were injected i.v. into C57BL/6 or congenic mice. One day later, mice were immunized i.n. with PBS or OVA (20 $\mu$ g)  $\pm$  flagellin or CT. Five days after immunization spleen and/or lymph nodes were sampled for analysis of CFSE or CTV dilution in OVA-specific CD4 T cells.

**Antigen presentation assays.** Presentation of OVA by APC to OT-II CD4 T cells were done as follows: C57BL/6 mice were immunized i.n. with flagellin and OVA (47.5µg), MdLNs were sampled 18h later, and total, CD11b<sup>+</sup>, and CD103<sup>+</sup> DC were FACS sorted. APC were cultured in round bottom 96 wells plate with 3-5×10<sup>5</sup> CTV-stained CD4<sup>+</sup> OT-II cells at a ratio of 1/10 (APC/T cells). At day 5, OT-II cell proliferation was assessed by flow cytometry and cytokines production in supernatants were measured by ELISA.

**ELISA.** Levels of OVA-specific antibodies were evaluated by ELISA as previously described (26). The Ig titer was defined as the reciprocal of the highest sample dilution yielding an absorbance value of 0.1 OD and was systematically compared with a reference serum. Titers are given as geometrical means of titers from individual mice. The cytokines IL-5, IL-13, IL-17 and IFN $\gamma$  were detected in supernatants using commercial kits (eBiosciences).

**Gene expression.** Total RNA from whole lung or cultured cells was extracted with the NucleospinRNA kits (Macherey-Nagel). 1µg RNA was reverse-transcribed using High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). Real time quantitative PCR were performed using SYBR Green or TaqMan® Universal PCR Master Mix and the primers available on request. The relative expression was normalized by  $\beta$ -actin (mouse) or histone H3 (human) gene expression. All qPCR experiments were performed with 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems).

**IL-1 $\beta$  detection and IL-IR1 blockade.** Mice were treated with flagellin (1µg) or PBS. Lungs were sampled after 6h and crushed in Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific) and Complete Protease Inhibitor Cocktails (Roche). Production and cleavage of IL-1 $\beta$  was assessed by western

blot. Mice were i.n. treated with 150µg of the recombinant IL-1RA (Anakinra, Kineret®; Biovitrum). PBS or flagellin (1µg) were i.n. administered after a 7h-resting period.

**Cell culture.** Normal human bronchial epithelial cell BEAS-2B were grown in complete epithelial cell culture medium (Promocell GmbH). Cells were stimulated with 1µg/ml flagellin, and sampled in RNA lysis buffer at the indicated time.

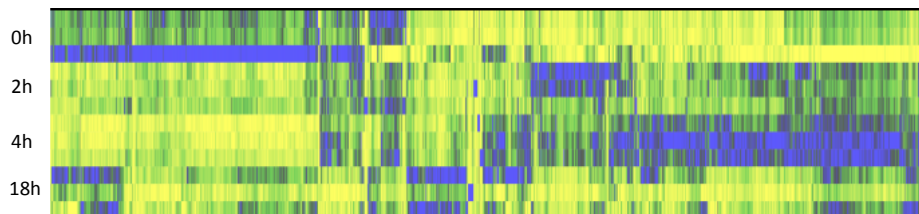
**Statistical analysis.** Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Mann-Withney test was used to compare two groups. Differences were considered statistically significant when P<0.05.

#### Acknowledgements.

We thank Dr. C. Faveeuw for critical reading of the manuscript, Dr. F. Trottein for *Cd11c-DTR* mice, Dr. R. Steinman for C4H3- specific antibodies, respectively. **Authorship** Contribution: D.F. planned studies, performed experiments, analyzed data, and wrote the manuscript; L.V.M. performed experiments and analyzed data. J.T., D.C. and P.S. performed experiments. N.V.R. contributed vital reagents. W.D.H. planned experiments and contributed vital reagents. D.H., H.J.M. and A.G.B. performed experiments and analyzed microarray data. J.C.S. supervised the project and wrote the manuscript. Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests. Correspondence: Jean-Claude Sirard, Institut Pasteur de Lille, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, INSERM U 1019 - CNRS UMR 8204, Equipe - Infection Pulmonaire et Immunité Innée, 1 rue du Professeur Calmette, 59019 Lille Cedex, France; e-mail: jean-claude.sirard@inserm.fr

- Lycke, N. 2012. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nat Rev Immunol* 12: 592-605.
- Buonaguro, L., and B. Pulendran. 2011. Immunogenomics and systems biology of vaccines. *Immunol Rev* 239: 197-208.
- Caskey, M., F. Lefebvre, A. Filali-Mouhim, M. J. Cameron, J. P. Goulet, E. K. Haddad, G. Breton, C. Trumpfheller, S. Pollak, I. Shimeliovich, A. Duque-Alarcon, L. Pan, A. Nelkenbaum, A. M. Salazar, S. J. Schlessinger, R. M. Steinman, and R. P. Sekaly. 2011. Synthetic double-stranded RNA induces innate immune responses similar to a live viral vaccine in humans. *J Exp Med* 208: 2357-2366.
- Blander, J. M., and L. E. Sander. 2012. Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat. *Nat Rev Immunol* 12: 215-225.
- Didierlaurent, A. M., S. Morel, L. Lockman, S. L. Giannini, M. Bisteau, H. Carlsen, A. Kiehl, O. Vosters, N. Vanderheyde, F. Schiavetti, D. Larocque, M. Van Mechelen, and N. Garçon. 2009. AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *J Immunol* 183: 6186-6197.
- Mosca, F., E. Tritto, A. Muzzi, E. Monaci, F. Bagnoli, C. Iavarone, D. O'Hagan, R. Rappuoli, and E. De Gregorio. 2008. Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 10501-10506.
- Tritto, E., A. Muzzi, I. Pesce, E. Monaci, S. Nuti, G. Galli, A. Wack, R. Rappuoli, T. Hussell, and E. De Gregorio. 2007. The acquired immune response to the mucosal adjuvant LTK63 imprints the mouse lung with a protective signature. *J Immunol* 179: 5346-5357.
- Seubert, A., E. Monaci, M. Pizzo, D. T. O'Hagan, and A. Wack. 2008. The adjuvants aluminum hydroxide and MF59 induce monocyte and granulocyte chemoattractants and enhance monocyte differentiation toward dendritic cells. *J Immunol* 180: 5402-5412.
- Le Borgne, M., N. Etchart, A. Goubier, S. A. Lira, J. C. Sirard, N. van Rooijen, C. Caux, S. Ait-Yahia, A. Vicari, D. Kaiserlian, and B. Dubois. 2006. Dendritic cells rapidly recruited into epithelial tissues via CCR6/CCL20 are responsible for CD8<sup>+</sup> T cell crosspriming in vivo. *Immunity* 24: 191-201.
- Kool, M., T. Soullie, M. van Nimwegen, M. A. Willart, F. Muskens, S. Jung, H. C. Hoogsteden, H. Hammad, and B. N. Lambrecht. 2008. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med* 205: 869-882.
- Randolph, G. J., C. Jakubczik, and C. Qu. 2008. Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells. *Curr Opin Immunol* 20: 52-60.
- Meredith, M. M., K. Liu, G. Darrasse-Jeze, A. O. Kamphorst, H. A. Schreiber, P. Guermont, J. Idoyaga, C. Cheong, K. H. Yao, R. E. Niec, and M. C. Nussenzweig. 2012. Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btb4d) defines the classical dendritic cell lineage. *J Exp Med* 209: 1153-1165.
- Miller, J. C., B. D. Brown, T. Shay, E. L. Gautier, V. Jovic, A. Cohain, G. Pandey, M. Leboeuf, K. G. Elpek, J. Helft, D. Hashimoto, A. Chow, J. Price, M. Greter, M. Bogunovic, A. Bellemare-Pelletier, P. S. Frenette, G. J. Randolph, S. J. Turley, and M. Merad. 2012. Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage. *Nat Immunol* 13: 888-899.
- Furuhashi, K., T. Suda, H. Hasegawa, Y. Suzuki, D. Hashimoto, N. Enomoto, T. Fujisawa, Y. Nakamura, N. Inui, K. Shibata, H. Nakamura, and K. Chida. 2012. Mouse lung CD103<sup>+</sup> and CD11b<sup>high</sup> dendritic cells preferentially induce distinct CD4<sup>+</sup> T-cell responses. *Am J Respir Cell Mol Biol* 46: 165-172.
- Plantinga, M., M. Williams, M. Vanheerswynghe, K. Deswarte, F. Branco-Madeira, W. Toussaint, L. Vanhoutte, K. Neyt, N. Killeen, B. Malissen, H. Hammad, and B. N. Lambrecht. 2013. Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity* 38: 322-335.
- Pesce, I., E. Monaci, A. Muzzi, E. Tritto, S. Tavarini, S. Nuti, E. De Gregorio, and A. Wack. 2010. Intranasal administration of CpG induces a rapid and transient cytokine response followed by dendritic and natural killer cell activation and recruitment in the mouse lung. *J Innate Immun* 2: 144-159.
- Langlet, C., S. Tamoutounour, S. Henri, H. Luche, L. Ardouin, C. Gregoire, B. Malissen, and M. Williams. 2012. CD64 expression distinguishes monocyte-derived and conventional dendritic cells and reveals their distinct role during intramuscular immunization. *J Immunol* 188: 1751-1760.
- Shi, C., and E. G. Pamer. 2011. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 11: 762-774.
- Schlitzer, A., N. McGovern, P. Teo, T. Zelante, K. Atarashi, D. Low, A. W. Ho, P. See, A. Shin, P. S. Wasan, G. Hoeffel, B. Malleret, A. Heiseke, S. Chew, L. Jardine, H. A. Purvis, C. M. Hilkens, J. Tam, M. Poidinger, E. R. Stanley, A. B. Krug, L. Renia, B. Sivasankar, L. G. Ng, M. Collin, P. Ricciardi-Castagnoli, K. Honda, M. Haniffa, and F. Ginhoux. 2013. IRF4 Transcription Factor-Dependent CD11b(+) Dendritic Cells in Human and Mouse Control Mucosal IL-17 Cytokine Responses. *Immunity* 38: 970-983.
- Iijima, N., L. M. Mattei, and A. Iwasaki. 2011. Recruited inflammatory monocytes stimulate antiviral Th1 immunity in infected tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 284-289.
- Mizel, S. B., and J. T. Bates. 2010. Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential. *Immunol* 185: 5677-5682.
- Didierlaurent, A., I. Ferrero, L. A. Otten, B. Dubois, M. Reinhardt, H. Carlsen, R. Blomhoff, S. Akira, J. P. Kraehenbuhl, and J. C. Sirard. 2004. Flagellin promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2-type response. *J Immunol* 172: 6922-6930.
- Kinnebrew, M. A., C. G. Buffie, G. E. Diehl, L. A. Zenewicz, I. Leiner, T. M. Hohl, R. A. Flavell, D. R. Littman, and E. G. Pamer. 2012. Interleukin 23 production by intestinal CD103(+)/CD11b(+) dendritic cells in response to bacterial flagellin enhances mucosal innate immune defense. *Immunity* 36: 276-287.
- Uematsu, S., M. H. Jang, N. Chevrier, Z. Guo, Y. Kumagai, M. Yamamoto, H. Kato, N. Sougawa, H. Matsui, H. Kuwata, H. Hemmi, C. Coban, T. Kawai, K. J. Ishii, O. Takeuchi, M. Miyasaka, K. Takeda, and S. Akira. 2006. Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c<sup>+</sup> lamina propria cells. *Nat Immunol* 7: 868-874.
- Van Maele, L., D. Fougereon, L. Janot, A. Didierlaurent, D. Cayet, J. Tabureau, M. Rumbo, S. Corvo-Chamaillard, S. Boulouaer, S. Jeffs, L. Vande Walle, M. Lamkanfi, Y. Lemoine, F. Erard, D. Hot, T. Hussell, B. Ryffel, A. Benecke, and J. C. Sirard. 2013. Airway structural cells regulate TLR5-mediated mucosal adjuvant activity. *Mucosal Immunol* 2013 Sep 25. doi: 10.1038.
- Nempont, C., D. Cayet, M. Rumbo, C. Bompard, V. Villeret, and J. C. Sirard. 2008. Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity. *J Immunol* 181: 2036-2043.
- Inaba, K., S. Turley, T. Iyoda, F. Yamada, S. Shimoyama, C. Reis e Sousa, R. N. Germain, I. Mellman, and R. M. Steinman. 2000. The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J Exp Med* 191: 927-936.
- Didierlaurent, A., J. Goulding, S. Patel, R. Snelgrove, L. Low, M. Bebiun, T. Lawrence, L. S. van Rijt, B. N. Lambrecht, J. C. Sirard, and T. Hussell. 2008. Sustained desensitization to bacterial Toll-like receptor ligands after resolution of respiratory influenza infection. *J Exp Med* 205: 323-329.
- Honko, A. N., and S. B. Mizel. 2004. Mucosal administration of flagellin induces innate immunity in the mouse lung. *Infect Immun* 72: 6676-6679.
- Janot, L., J. C. Sirard, T. Secher, N. Noulin, L. Fick, S. Akira, S. Uematsu, A. Didierlaurent, T. Hussell, B. Ryffel, and F. Erard. 2009. Radioresistant cells expressing TLR5 control the respiratory epithelium's innate immune responses to flagellin. *Eur J Immunol* 39: 1587-1596.
- Munoz, N., L. Van Maele, J. M. Marques, A. Rial, J. C. Sirard, and J. A. Chabalgoity. 2010. Mucosal administration of flagellin protects mice from Streptococcus pneumoniae lung infection. *Infect Immun* 78: 4226-4233.
- Barletta, K. E., R. E. Cagnina, K. L. Wallace, S. I. Ramos, B. Mehrad, and J. Linden. 2012. Leukocyte compartments in the mouse lung: distinguishing between marginated, interstitial, and alveolar cells in response to injury. *J Immunol Methods* 375: 100-110.
- Satpathy, A. T., W. Ke, J. C. Albring, B. T. Edelson, N. M. Kretzer, D. Bhattacharya, T. L. Murphy, and K. M. Murphy. 2012. Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages. *J Exp Med* 209: 1135-1152.

34. Wilson, R. H., S. Maruoka, G. S. Whitehead, J. F. Foley, G. P. Flake, M. L. Sever, D. C. Zeldin, M. Kraft, S. Garantziotis, H. Nakano, and D. N. Cook. 2012. The Toll-like receptor 5 ligand flagellin promotes asthma by priming allergic responses to indoor allergens. *Nat Med* 18: 1705-1710.
35. Bates, J. T., S. Uematsu, S. Akira, and S. B. Mizel. 2009. Direct stimulation of Tlr5+/+ CD11c+ cells is necessary for the adjuvant activity of flagellin. *J Immunol* 182: 7539-7547.
36. Sanders, C. J., D. A. Moore, 3rd, I. R. Williams, and A. T. Gewirtz. 2008. Both radioresistant and hemopoietic cells promote innate and adaptive immune responses to flagellin. *J Immunol* 180: 7184-7192.
37. Pang, I. K., T. Ichinohe, and A. Iwasaki. 2013. IL-1R signaling in dendritic cells replaces pattern-recognition receptors in promoting CD8(+) T cell responses to influenza A virus. *Nat Immunol* 14: 246-253.
38. Lambrecht, B. N., and H. Hammad. 2012. Lung dendritic cells in respiratory viral infection and asthma: from protection to immunopathology. *Annu Rev Immunol* 30: 243-270.
39. Calabro, S., M. Tortoli, B. C. Baudner, A. Pacitto, M. Cortese, D. T. O'Hagan, E. De Gregorio, A. Seubert, and A. Wack. 2011. Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. *Vaccine* 29: 1812-1823.
40. Magnusson, S. E., J. M. Reimer, K. H. Karlsson, L. Lilja, K. L. Bengtsson, and L. Stertman. 2013. Immune enhancing properties of the novel Matrix-M adjuvant leads to potentiated immune responses to an influenza vaccine in mice. *Vaccine* 31: 1725-1733.
41. Nathan, C. 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 6: 173-182.
42. Holt, P. G., D. H. Strickland, M. E. Wikstrom, and F. L. Jahnsen. 2008. Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nat Rev Immunol* 8: 142-152.
43. Fahlen-Yrliid, L., T. Gustafsson, J. Westlund, A. Holmberg, A. Strombeck, M. Blomquist, G. G. MacPherson, J. Holmgren, and U. Yrliid. 2009. CD11c(high) dendritic cells are essential for activation of CD4+ T cells and generation of specific antibodies following mucosal immunization. *J Immunol* 183: 5032-5041.
44. Sporri, R., and C. Reis e Sousa. 2005. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function. *Nat Immunol* 6: 163-170.
45. Hammad, H., M. Chieppa, F. Perros, M. A. Willart, R. N. Germain, and B. N. Lambrecht. 2009. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat Med* 15: 410-416.
46. Tan, A. M., H. C. Chen, P. Pochard, S. C. Eisenbarth, C. A. Herrick, and H. K. Bottomly. 2010. TLR4 signaling in stromal cells is critical for the initiation of allergic Th2 responses to inhaled antigen. *J Immunol* 184: 3535-3544.
47. Iwasaki, A. 2007. Mucosal dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 25: 381-418.
48. Flores-Langarica, A., J. L. Marshall, J. Hitchcock, C. Cook, J. Jobanputra, S. Bobat, E. A. Ross, R. E. Coughlan, I. R. Henderson, S. Uematsu, S. Akira, and A. F. Cunningham. 2012. Systemic flagellin immunization stimulates mucosal CD103+ dendritic cells and drives Foxp3+ regulatory T cell and IgA responses in the mesenteric lymph node. *J Immunol* 189: 5745-5754.
49. Honko, A. N., N. Sriranganathan, C. J. Lees, and S. B. Mizel. 2006. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. *Infect Immun* 74: 1113-1120.
50. Kandasamy, M., P. C. Ying, A. W. Ho, H. R. Sumatoh, A. Schlitzer, T. R. Hughes, D. M. Kemeny, B. P. Morgan, F. Ginhoux, and B. Sivasankar. 2013. Complement mediated signaling on pulmonary CD103(+) dendritic cells is critical for their migratory function in response to influenza infection. *PLoS Pathog* 9: e1003115.
51. Tortola, L., E. Rosenwald, B. Abel, H. Blumberg, M. Schafer, A. J. Coyle, J. C. Renauld, S. Werner, J. Kisielow, and M. Kopf. 2012. Psoriasisiform dermatitis is driven by IL-36-mediated DC-keratinocyte crosstalk. *J Clin Invest* 122: 3965-3976.
52. Nakano, H., J. E. Burgents, K. Nakano, G. S. Whitehead, C. Cheong, C. D. Bortner, and D. N. Cook. 2012. Migratory properties of pulmonary dendritic cells are determined by their developmental lineage. *Mucosal Immunol*.
53. Otero, K., A. Vecchi, E. Hirsch, J. Kearley, W. Vermi, A. Del Prete, S. Gonzalez-Feo, C. Garlanda, O. Azzolino, L. Salogni, C. M. Lloyd, F. Facchetti, A. Mantovani, and S. Sozzani. 2010. Nonredundant role of CCRL2 in lung dendritic cell trafficking. *Blood* 116: 2942-2949.

**A****B**

### Canonical pathways

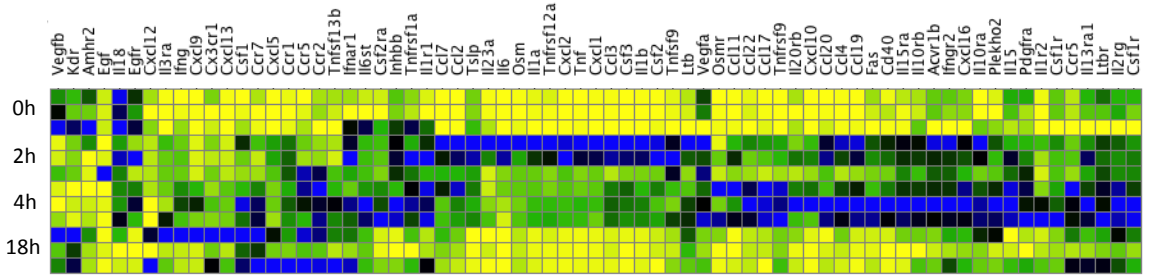
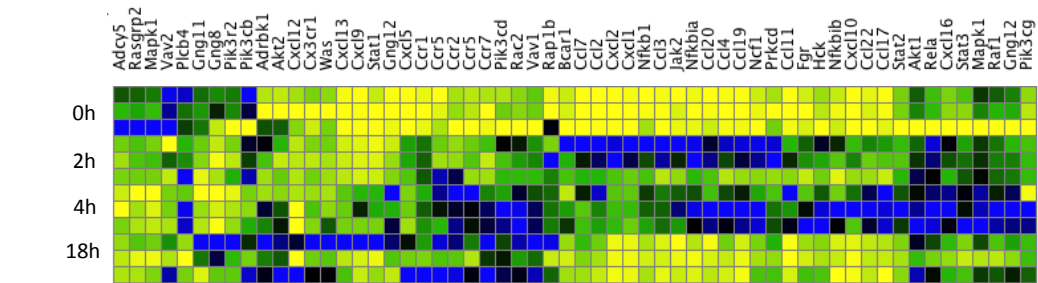
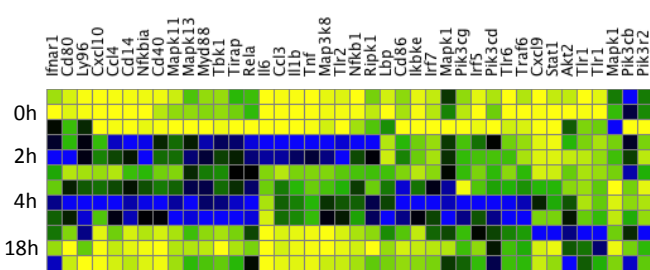
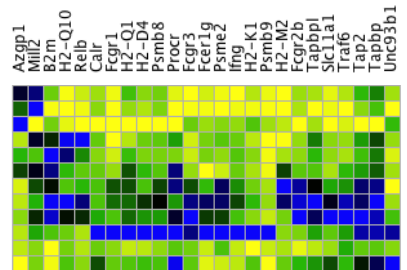
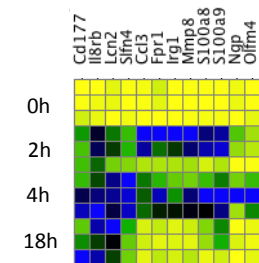
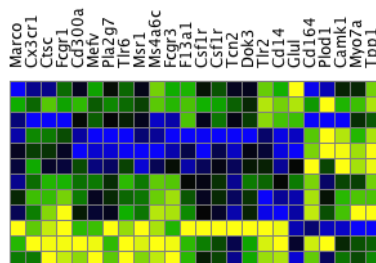
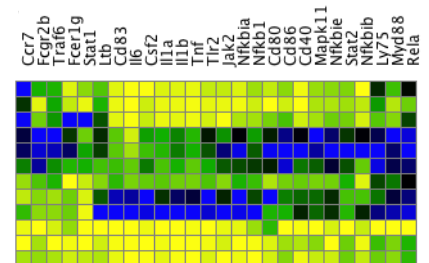
	- log (p value)		
	2h	4h	18h
IL-10 Signaling	13.08	18.39	7.43
Acute Phase Response Signaling	14.79	18.08	7.04
Dendritic Cell Maturation	8.76	16.92	3.32
Activation of IRF by Cytosolic Pattern Recognition Receptors	5.72	15.93	1.39
TREM1 Signaling	13.64	14.14	5.91
IL-6 Signaling	11.65	12.66	2.83
Interferon Signaling	4.23	12.37	0.00
NF- $\kappa$ B Signaling	11.72	12.27	3.30

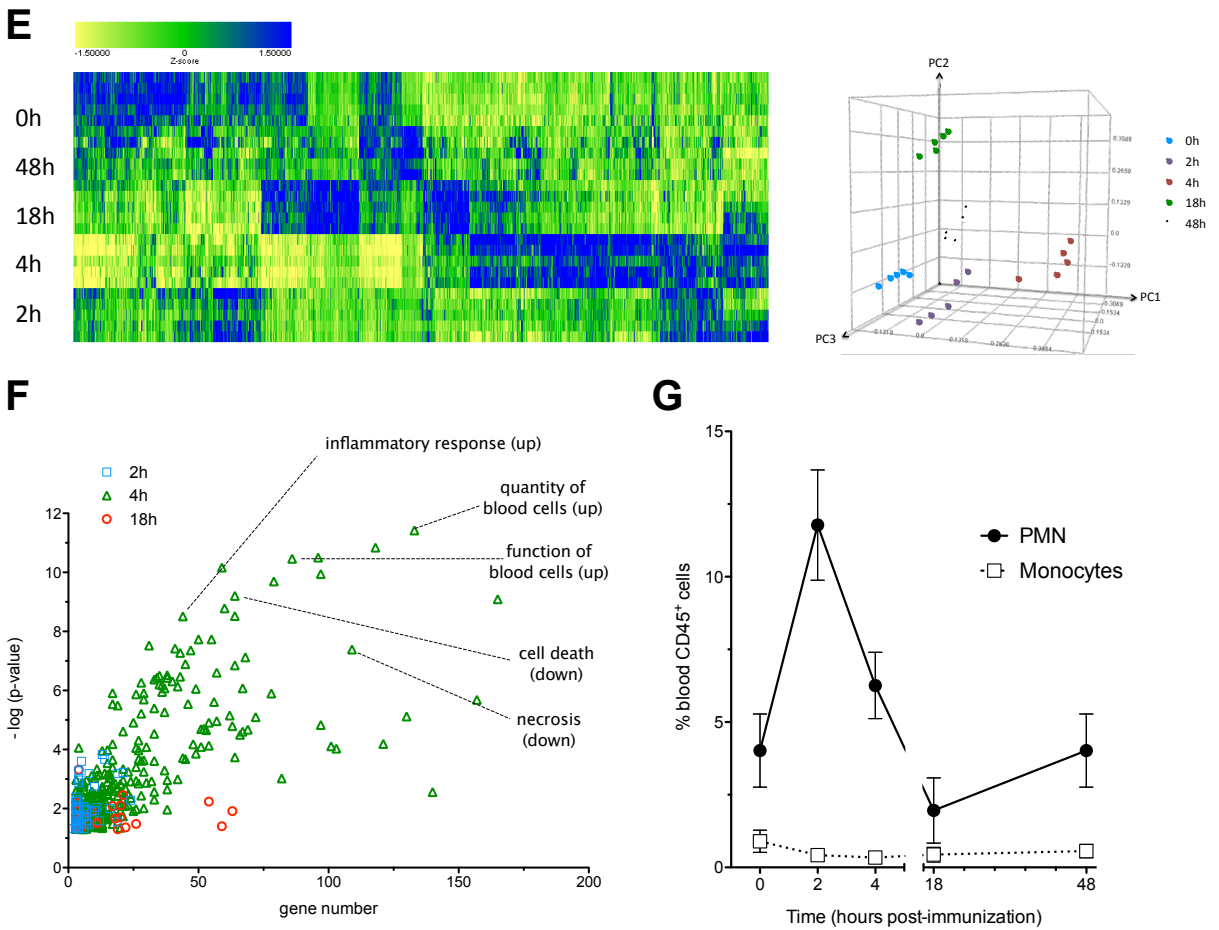
**C**

### Biological functions

	- log (p value)		
	2h	4h	18h
Function of leukocytes	52,38	67,47	19,51
Inflammatory response	50,88	55,68	21,26
Migration of blood cells	48,17	54,99	n.d.
Cell movement	39,36	38,72	12,95
Infiltration of cells	37,37	38,91	n.d.
Function of APC	32,95	37,82	9,71
Adhesion of immune cells	24,12	32,60	18,73
Production of antibody	n.d.	31,62	10,83



**D****Cytokine-cytokine receptor interaction****Chemokine signaling pathway****TLR signaling pathway****Ag processing and presentation****PMN****Monocytes / Macrophages****DC maturation****Supplemental Figure 1 : Fougeron et al. (continued)**

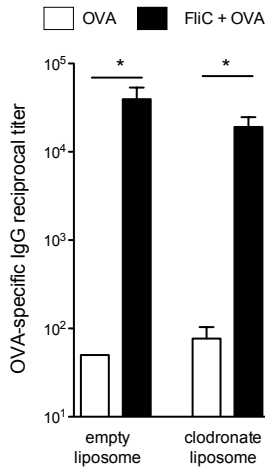
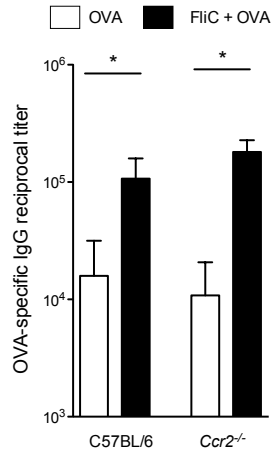
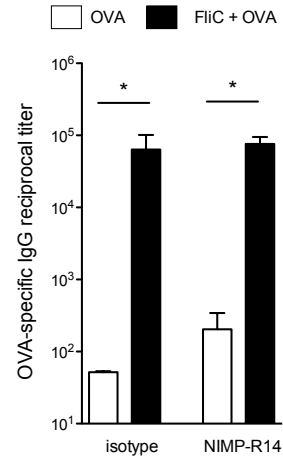


**Supplemental Figure 1 (continued). The flagellin-specific lung and blood response displays specific features of transient pro-inflammatory response.**

Total lung RNA and blood RNA was extracted with the Nucleospin RNA kits (Macherey-Nagel). Lung RNA was processed on Applied Biosystems Mouse Whole Genome Arrays v2.0 that were then analyzed using the NeONORM method as described (Noth et al. 2006. Genomics Proteomics Bioinformatics 4:90-109). Blood RNA was processed on Agilent whole mouse genome microarrays that were then analyzed using the Rosetta Resolver Biosoftware. Microarray data were MIAME compliant and deposited in the publicly available database: <http://mace.ihes.fr> with accession number: 2176499768 and <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> with accession number: GSE46421. Gene lists containing group means of expression, p-values and standard fold changes were utilized as input for subsequent bioinformatics analysis. Genes belonging to the same biological functions/pathways were mapped using Ingenuity Pathway Analysis 1.0 (IPA, Ingenuity Systems), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>), and The Immunological Genome Project ([www.immgen.org](http://www.immgen.org)). Heat maps were generated using Gene-E (Broad Institute). C57BL/6 mice (n=3 per group) were treated i.n. with flagellin (FlC) for 2h, 4h and 18h. Lung whole-genome microarrays were analyzed. Differentially expressed genes relative to controls (0h) were used for analysis. Heat maps represent transcriptional responses based on average linkage method and Pearson Correlation as distance metric (A, D). (A) Global transcriptional response. (B) Main canonical pathways and (C) biological functions significantly upregulated upon flagellin administration identified by IPA analysis. The significance is expressed as “ $-\log(p\text{-value})$ ”. (D) Heat maps of KEGG molecular functions and cell signatures (established according to the Immgen database). (E-G) C57BL/6 mice (n=5 per group) were immunized with i.n. flagellin for 2h, 4h, 18h and 48h and blood whole-genome microarrays were performed. Differentially expressed genes relative to controls (0h) were used for analysis. Heat map represents the global blood response based on average linkage method and Pearson Correlation as distance metric and Principal Component Analysis (E). The most significant canonical pathways defined by IPA are represented in panel (F) with mention of their up- or down-regulation. (G) Changes in blood phagocytes were analyzed by flow cytometry with a similar kinetic.

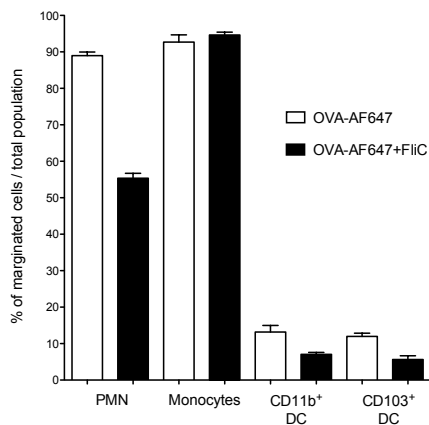
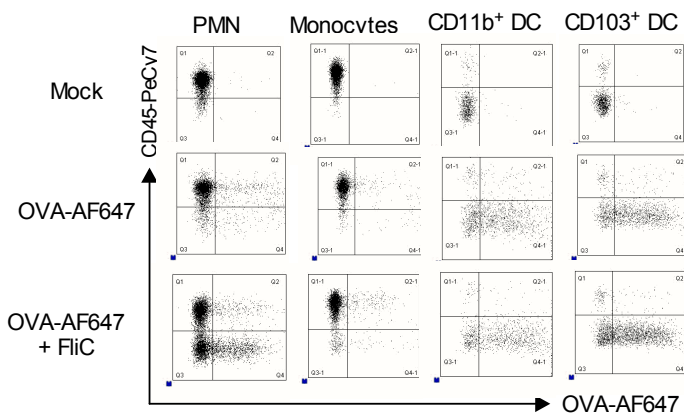
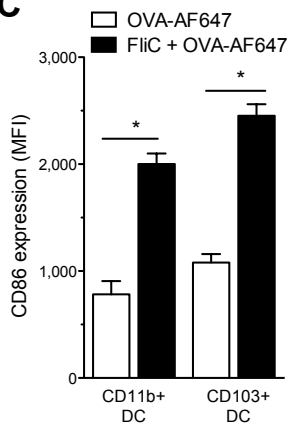
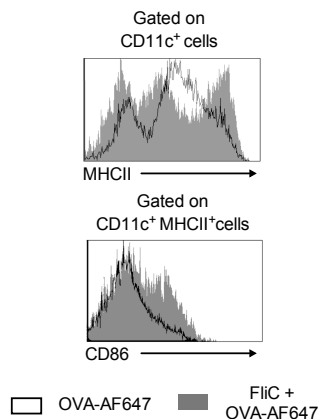
**A**

Type of cells	Model	% of depletion	
		Lung	Blood
PMN	NIMP.R14	100 %	100 %
Monocytes	Clodronate §	95±4%	97±2%

**B****C****D**

### Supplementary Figure 2. Monocytes and neutrophils are dispensable for flagellin-mediated adjuvant activity.

Neutrophils were depleted by i.p. injection of anti-Ly6G (NIMP.R14, 200µg), or control isotype HB152 (rat IgG2b, 200µg). Circulating monocytes were depleted by i.v. injection of clodronate liposome or empty liposomes (Van Rooijen and Sanders, 1994. J Immunol Methods 174:83-93). Immunizations were performed 12h to 24h after the depletions. (A) C57BL/6 and NMRI (§) mice were injected i.p. with Ly6G-specific depleting antibody NIMP.R14 or isotype HB152 (control), or i.v. with clodronate liposomes or empty liposomes (control). The percentage of depletion was measured with respects to control mice. Neutrophils (CD45<sup>+</sup>lin<sup>neg</sup>CD11b<sup>high</sup>Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>) and monocytes (CD45<sup>+</sup>lin<sup>neg</sup>CD11b<sup>high</sup>Ly6C<sup>high</sup>Ly6G<sup>neg</sup>) were counted in the lung and in the blood after 12h to 24h. (B) NMRI mice (n=5-8) were injected i.v. with clodronate liposomes or empty liposomes and immunized i.n. with OVA ± FliC. OVA-specific IgG titer was determined in the serum at day 21. *Ccr2*<sup>-/-</sup> (n=8-9) (C) and NIMP.R14-depleted C57BL/6 mice (n=7-8) (D) were vaccinated i.n. at day 0 and day 21. OVA-specific IgG titers were measured by ELISA at day 28. Data are expressed as the mean ± SEM and are representative of 1-2 experiments. Statistical significance (\*p<0.05) was determined using the Mann-Whitney test.

**A****B****C****D**

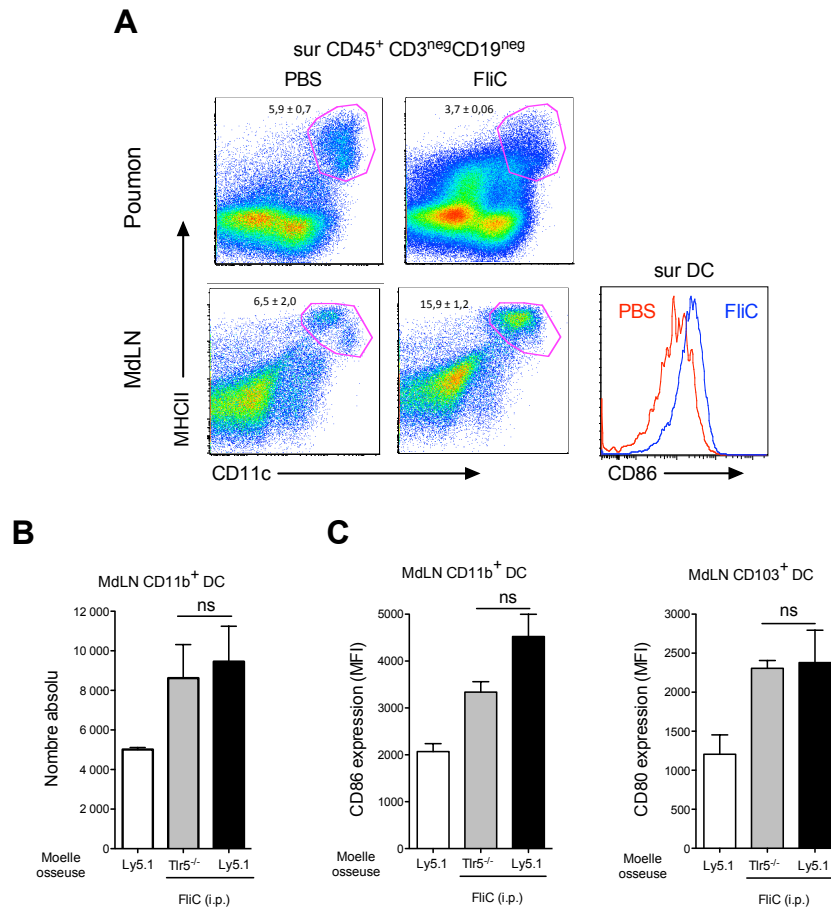
### Supplementary Figure 3. Compartmentalization of monocytes, dendritic cells and neutrophils into the lung vasculature and parenchyma.

(A-B) C57BL/6 mice (n=2-4) were treated i.n. with fluorescent OVA-AF647 in the presence or absence of flagellin. Six hours post-immunization, mice were injected i.v. with anti-CD45-PeCy7 (1 $\mu$ g) and lung tissues were sampled 5 minutes later. Cells stained by anti-CD45-PeCy7 are defined as marginated cells. (A) Percentage of margination was determined for monocytes (CD11b<sup>high</sup>Ly6C<sup>high</sup>Ly6G<sup>neg</sup>), DC (CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>CD11b<sup>+/neg</sup>CD103<sup>+/neg</sup>), and PMN (CD11b<sup>high</sup>Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>). (B) Representative plots showing the correlation between antigen uptake and cell localization. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM, and are representative of two experiments (\* p < 0.05). (C-D) C57BL/6 (n=3-4) were immunized i.n. with ovalbumin (OVA)-AF647  $\pm$  flagellin (FlIc). Lungs were sampled 18h after administration for flow cytometry analysis. (C) Functional activation of lung DCs (CD86 expression). Data are presented as the mean fluorescence intensity. (D) Representative histograms of MHCII and CD86 expression by the indicated population in the lung

### 3.3 RESULTATS COMPLEMENTAIRES A L'ARTICLE 2

Ce travail a consisté en l'analyse de l'activation et/ou du recrutement des cellules innées pulmonaires. En plus des PMN, monocytes inflammatoires et DC, la dynamique des polynucléaires éosinophiles a été analysée de 6h à 18h après l'injection de flagelline. Ainsi, l'injection d'une dose unique de flagelline n'induit pas le recrutement d'éosinophiles dans la muqueuse pulmonaire. De plus, l'analyse microarrays des gènes codants pour des chimiokines recrutant les éosinophiles a montré une activation transcriptionnelle des gènes codant CCL7 et CCL11 mais pas CCL5, CCL13 et CCL24. De même l'IL-5, cytokine activant les éosinophiles n'est pas modulée dans le poumon après l'injection de flagelline.

Dans cette étude nous avons montré que les DC pulmonaires, pouvaient être activées de façon TLR5 indépendante après administration de flagelline par voie i.n. A l'inverse, la maturation des DC spléniques induite par la flagelline i.p. est strictement dépendante de leur expression de TLR5. Cependant dans des souris WT nous avons remarqué que l'administration i.p. de flagelline semble induire une inflammation pulmonaire et la migration des DC résidentes vers les MdLN dans une cinétique similaire à celle observée par voie i.n. (**Figure S4.A**). En effet le nombre de DC pulmonaire diminue 18h après l'administration de flagelline et, en parallèle, augmente dans les MdLN, suggérant une migration des DC pulmonaires. Ainsi tout comme par voie i.n., l'administration i.p. de flagelline aboutit à la présence de DC migratoires matures dans les MdLN (exprimant fortement les marqueurs CD86 et CD80). Néanmoins, contrairement à ce qui est observé dans les DC spléniques, il est notable que la flagelline i.p. semble activer la migration des DC dans les MdLN, même lorsque celles-ci n'expriment pas TLR5 (chimère  $Tlr5^{-/-} \rightarrow WT$ ) (**Figure S4.B-C**). Il est donc possible que cette activation indirecte soit due, en tout ou partie, à une stimulation de l'épithélium pulmonaire (vraisemblablement basolatérale) par la flagelline. En effet, au laboratoire il a précédemment été démontré que l'administration de flagelline par voie i.p. stimule une production de chimiokines et de cytokines dans le poumon (par exemple CCL20, CXCL5 ou IL-6) dépendante de la signalisation TLR5 épithéliale (Van Maele, 2010).

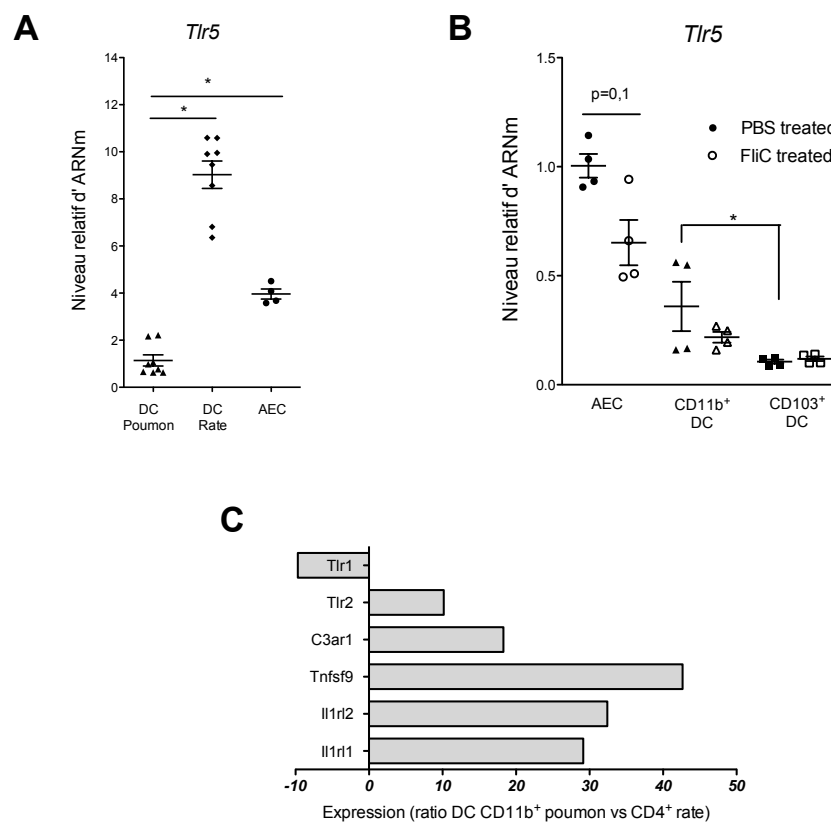


**Figure S4 : L'injection systémique de flagelline conduit à l'activation indirecte des DC pulmonaire**

(A) Des souris C57BL/6 (n=3) ont été injectées par voie i.p. avec 1 µg de flagelline et le poumon et les MdLN ont été prélevés 18h après pour dénombrement des cellules et analyse de leur activation par cytométrie en flux. Les graphes montrent le marquage des DC ainsi que leur pourcentage parmi la population CD45<sup>+</sup>CD3<sup>neg</sup>CD19<sup>neg</sup>. L'expression de CD86 dans les DC des MdLN a également été mesurée. (B-C) Des souris chimères WT→WT (Ly5.1→Ly5.2) et Tlr5<sup>-/-</sup>→WT ont été immunisées par voie i.p. et les MdLN ont été prélevés 18h après. Le nombre (B) et l'expression des marqueurs de maturation CD86 et CD80 (C) ont été estimés. L'activation des DC spléniques de ces souris est présentée dans l'article (**article 2, figure 5B**).

Par ailleurs il est intéressant de comparer ces résultats avec le niveau d'expression de TLR5 retrouvé sur des cellules primaires alvéolaires et sur des DC pulmonaires ou spléniques (**Figure S5.A**). Ainsi les DC pulmonaires expriment environ 10 fois moins de *Tlr5* comparativement aux DC spléniques, et 4 fois moins par rapport à des cellules primaires alvéolaires. Cependant, le niveau d'expression de *Tlr5* dans les DC pulmonaires et les cellules primaires alvéolaires est indépendant de la stimulation flagelline, respectivement *in vivo* et *in vitro*, et diffère peu entre les DC CD11b<sup>+</sup> et DC CD103<sup>+</sup> du poumon (**Figure S5.B**). Les données du consortium Immgen sur la signature transcriptionnelle des DC nous ont conduit à analyser l'expression d'autres récepteurs sur les populations de DC pulmonaires. Ainsi les récepteurs détectant les cytokines de la famille de l'IL-1, tels que IL-1RL1 (ou ST2), IL-1RL2 (ou IL-36R) sont significativement plus exprimés à l'état basal sur les DC CD11b<sup>+</sup>

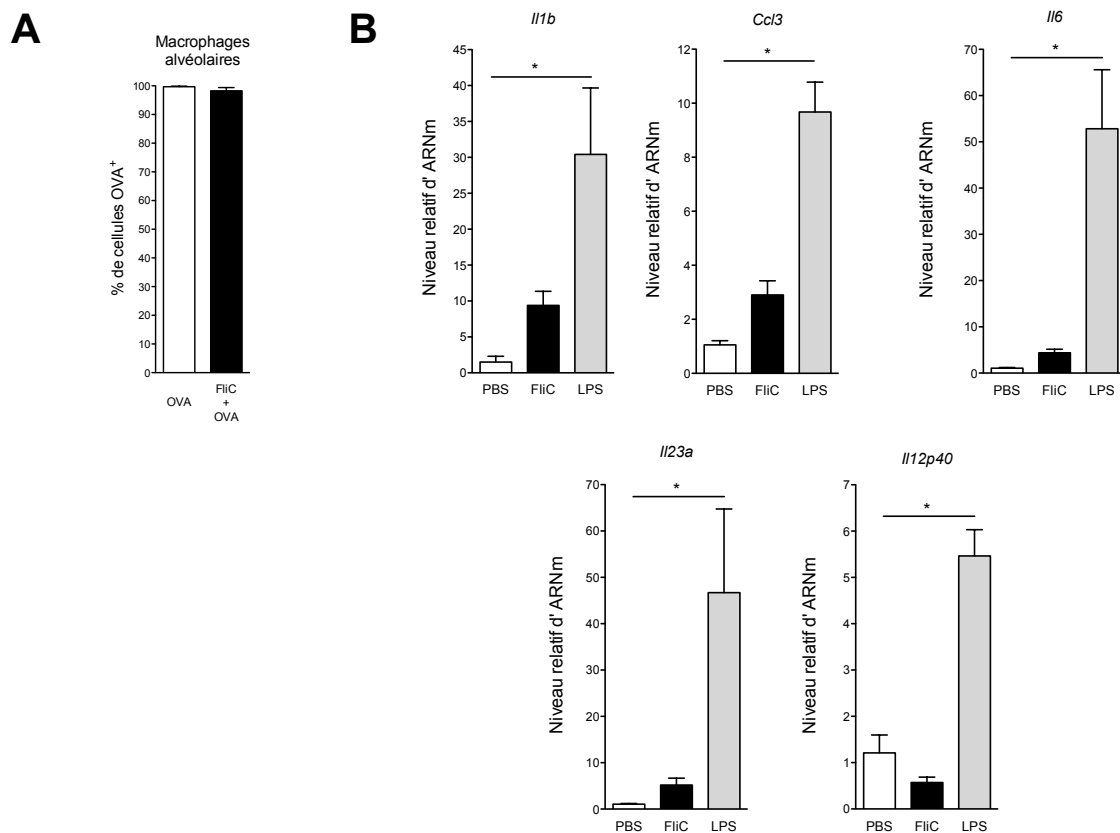
pulmonaires comparativement aux DC CD4<sup>+</sup> de la rate (**Figure S5.C**). De même, l'expression des récepteurs IL-1R1 et IL-1R2 par les DC CD11b<sup>+</sup> pulmonaires semble supérieure à celle des DC CD4<sup>+</sup> de la rate. Le récepteur au complément C3aR, récemment impliqué dans l'activation des DC dans un modèle d'infection grippale (Kandasamy, 2013) est plus exprimé au sein des DC pulmonaires CD11b<sup>+</sup> que les DC spléniques CD4<sup>+</sup>. Enfin, à l'instar de *Tlr5*, il est intéressant de constater que *Tlr11*, autre récepteur pouvant reconnaître la flagelline chez la souris (Mathur, 2012), possède une expression supérieure sur les DC spléniques comparativement aux DC pulmonaires (données Immgen). Cependant la généralisation de l'expression supérieure des TLR par les DC pulmonaires et spléniques n'est pas vérifiée, notamment pour TLR2. L'ensemble de ces observations suggère que les DC pulmonaires disposent constitutivement d'une capacité à s'activer par voie indirecte en réponse à des médiateurs inflammatoires dérivés de l'épithélium.



**Figure S5 : Expression différentielle des récepteurs immunitaires par les DC pulmonaires et spléniques**

(A) Des DC de rate et de poumon de souris naïves ont été triées par cytométrie en flux et l'expression de *Tlr5* a ensuite été analysée par RT-PCR en temps réel. L'expression de *Tlr5* a également été déterminée sur des cellules primaires alvéolaires (AEC) en culture. Le niveau relatif de *Tlr5* a été normalisé à l'expression de l'actine- $\beta$ , et l'expression dans les DC pulmonaires a été arbitrairement fixée à 1. (B) Niveau relatif des ARNm de *Tlr5* sur des AEC et des DC CD11b<sup>+</sup> et CD103<sup>+</sup> traitées ou non par la flagelline. L'expression par les AEC non activées a été arbitrairement fixée à 1. (C) La comparaison des DC CD4<sup>+</sup> spléniques et CD11b<sup>+</sup> CD24<sup>+</sup> pulmonaires a été effectuée avec l'outil "Comparison Population" disponible sur le site [www.immgen.org](http://www.immgen.org).

Dans ce travail nous nous sommes également intéressés aux macrophages alvéolaires. Dans un modèle d'administration i.n. d'ovalbumine fluorescente, nous avons confirmé que les macrophages alvéolaires capturent très efficacement l'antigène, et ceci indépendamment de la présence de flagelline (**Figure S6.A**). Cependant, contrairement au LPS, la flagelline n'active que faiblement la transcription de gènes codant des cytokines ou des chimiokines dans les macrophages (**Figure S6.B et article 1 figure supplémentaire 5**). De plus, dans les souris chimères, la reconstitution du compartiment alvéolaire a été évaluée >90% (non montré) (Murphy, 2008). Ainsi, l'activation des macrophages alvéolaires ne contribue pas de façon majeure à l'effet adjuvant muqueux de la flagelline.



**Figure S6 : Les macrophages alvéolaires capturent l'antigène mais ne sont pas activés par la flagelline**

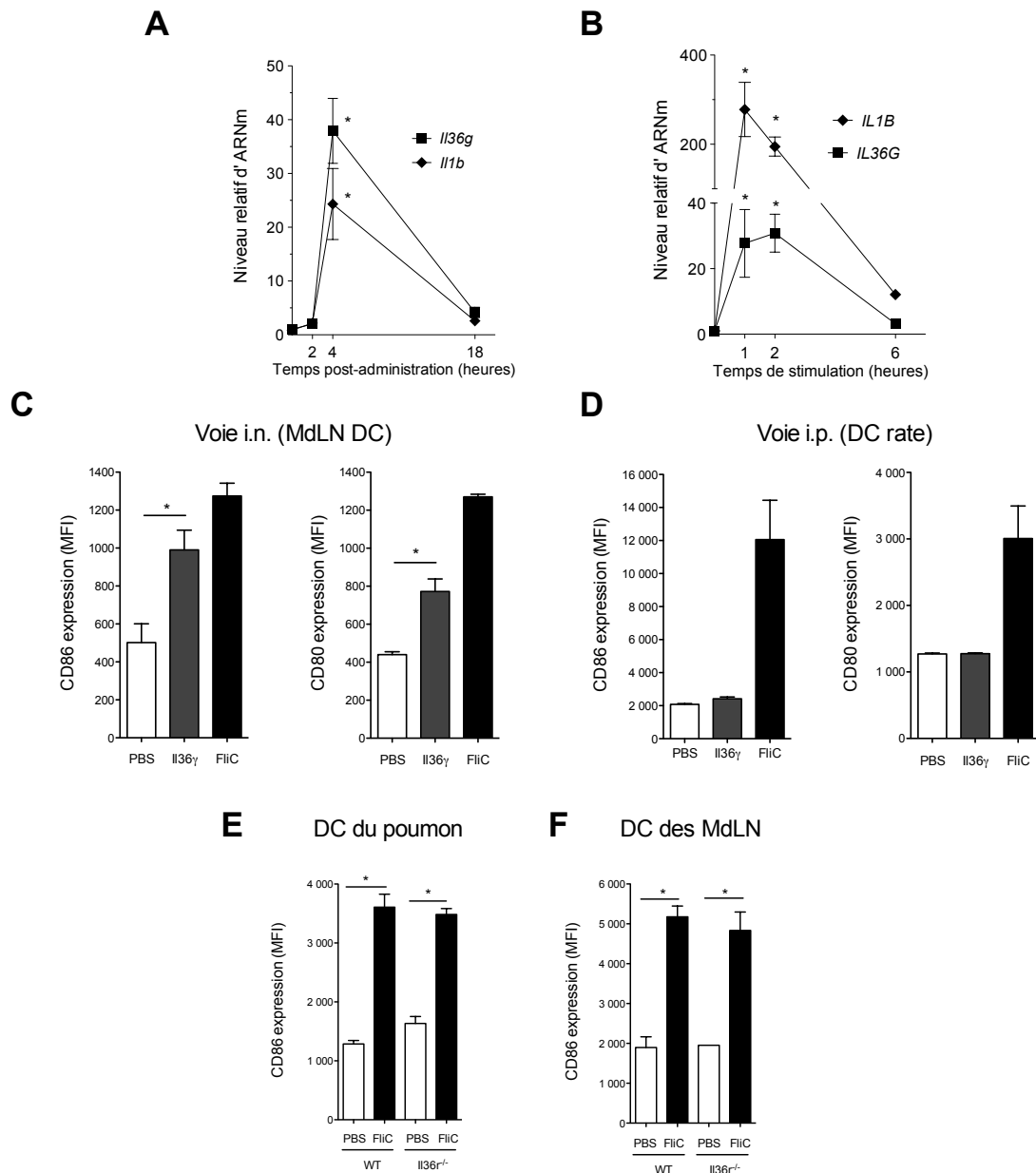
(A) L'ovalbumine fluorescente (OVA-AF647, 10 $\mu$ g)  $\pm$  flagelline (FliC, 1 $\mu$ g) ont été administrés par voie i.n. et le BAL a été prélevé 6h après. Le pourcentage de macrophages (CD45<sup>+</sup> FCS<sup>high</sup> CD11b<sup>med</sup>CD64<sup>+</sup>) positifs pour la capture de l'OVA a été déterminé. (B) La flagelline (FliC) ou le LPS (1 $\mu$ g) ont été administrés par voie intranasale et le BAL a été prélevé 2h après. Les cellules totales du BAL ont été analysées en qPCR. Les niveaux relatifs d'expression des gènes ont été normalisés à l'expression de l'*actine-β*, et le niveau d'expression correspondant au traitement PBS a été arbitrairement fixé à 1.

La dernière partie de ce travail de thèse a consisté en la recherche des médiateurs épithéliaux produits en réponse à l'administration de flagelline i.n. et responsables de la transactivation fonctionnelle des DC pulmonaires. Nos premiers résultats présentés dans



l'article 2 suggèrent que les cytokines TSLP, IL-33, IL-25, IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  d'origine épithéliale ne sont pas responsables de la transactivation des cDC. L'analyse combinée de la littérature et des gènes induits dans le poumon total par la flagelline nous a conduit à considérer l'implication de la cytokine IL-36 $\gamma$ . Cette cytokine de la famille de l'IL-1 est caractérisée par une production d'origine épithéliale et une capacité à activer les DC *in vitro*. Dans le poumon et dans des lignées de cellules épithéliales humaines, nous avons montré que la transcription de ce gène est activée par la flagelline (**Figure S7.A-B**). En parallèle, nous avons observé que l'administration i.n. d'IL-36 $\gamma$  induit la maturation des DC dans les MdLN, au contraire de son administration par voie i.p (**Figure S7.C-D**). Bien que par voie systémique, l'IL-36 $\gamma$  puisse être dégradée ou en quantité insuffisante pour être détectée par les DC spléniques, ces résultats peuvent être associés à l'expression supérieure du récepteur à l'IL-36 $\gamma$  (IL-36R ou IL1-RL2) sur les DC CD11b<sup>+</sup> du poumon comparativement à leurs homologues CD4<sup>+</sup> de la rate (**Figure S5.C**, d'après [www.immgen.org](http://www.immgen.org)). Par la suite, nous avons testé la contribution de la signalisation IL-36 $\gamma$ /IL-36R dans la maturation des DC pulmonaires induite par la flagelline. Nos expériences ont indiqué que l'administration i.n. de flagelline à des souris *Il36r<sup>-/-</sup>* produit un effet de maturation des cDC migratoires et pulmonaires similaire à celui observé dans des souris WT (**Figure S7.E-F**). Suite à l'administration i.n. de flagelline, l'IL-36 $\gamma$ , à l'instar des autres cytokines de la famille de l'IL-1, ne semble donc pas impliquée dans la transactivation des DC pulmonaires.

Ainsi les cytokines de la famille de l'IL-1 (signalant via MyD88) ne contribuent pas à la transactivation des cDC pulmonaires induite par la flagelline. L'activation des DC par le TSLP semble peu probable mais devra être considérée. L'activité du GM-CSF sur l'activation et la migration des DC constitue cependant une piste intéressante d'autant plus que sa transcription dans les cellules épithéliales pulmonaires est fortement induite par la flagelline.



**Figure S7 : La cytokine IL-36 $\gamma$  n'est pas requise pour l'effet adjuvant muqueux de la flagelline**

(A) Des souris C57BL/6 ont été immunisées par voie i.n. avec 1 $\mu$ g de flagelline et le poumon a été prélevé pour analyse PCR après 2h, 4h et 18h (n=4). De façon complémentaire à l'expression des gènes montrée dans la Figure 7 de l'article 2, l'expression du gène codant pour l'IL-36 $\gamma$  a été déterminée. (B) L'expression d'*IL36g* a également été déterminée dans des lignées de cellules épithéliales humaines (BEAS-2B) suite à une stimulation flagelline. L'expression de l'*Il-1 $\beta$*  est montrée comme référence. Les niveaux relatifs d'expression des gènes ont été normalisés à l'expression de l'*actine- $\beta$* , et le niveau dans la condition non stimulée a été arbitrairement fixé à 1. (C-D) L'IL-36 $\gamma$  (Adipogen) a été injectée à la dose de 500 ng par voie i.n. ou i.p.. Après 18h les ganglions médiastinaux (MdlN) et la rate ont été respectivement prélevés et l'expression de marqueurs de maturation des DC a été analysée (CD86 et CD80). Pour chaque voie, la flagelline (FliC, 1 $\mu$ g) a été administrée comme contrôle positif. (E-F) Des souris C57BL/6 (wild type, WT) et des souris *Il36r<sup>-/-</sup>* ont été traitée par voie i.n avec FliC (1 $\mu$ g). L'activation des DC du poumon et des MdlN a été mesurée après 18h.

## Discussion

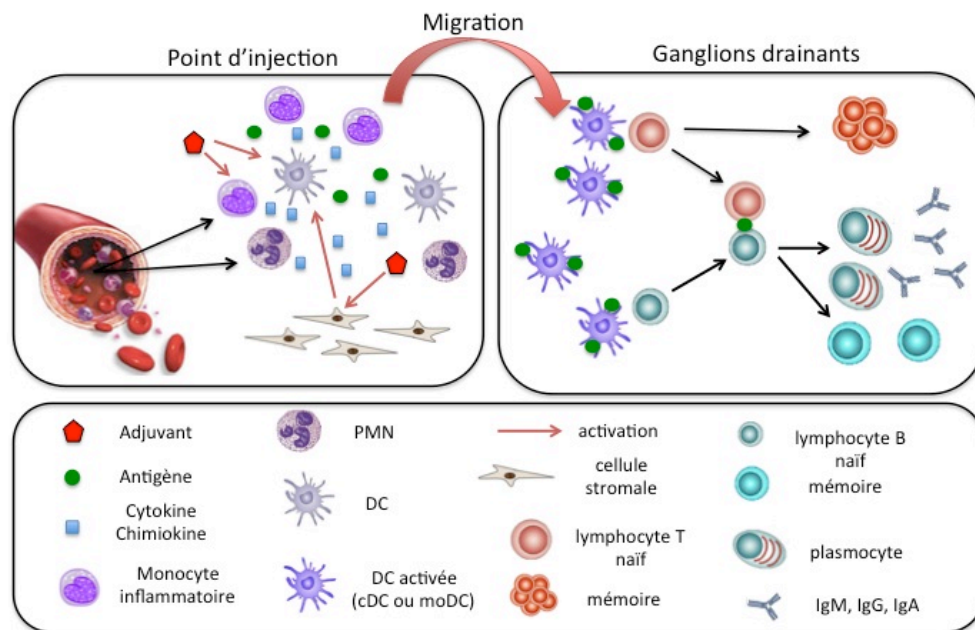
---

## Discussion

Ce travail de thèse a consisté à disséquer les aspects moléculaires et cellulaires du mécanisme d'action par voie intranasale de l'adjuvant agoniste de TLR5 qu'est la flagelline. En particulier, des analyses des cellules cibles de l'adjuvant et des APC impliquées dans l'activité immunomodulatrice de la flagelline ont été conduites. Ces travaux nous ont permis tout d'abord de mettre en évidence que l'action de l'adjuvant flagelline est prédéterminée par son activité spécifique au sein du compartiment radio-résistant du tractus respiratoire et plus particulièrement les cellules épithéliales. Ainsi, la signalisation TLR5 dans les cellules épithéliales est essentielle à la vaccination au contraire de celle dans les cellules présentatrices d'antigènes. Cette observation est majeure pour le développement de nouveaux adjuvants de la vaccination muqueuse. Dans la seconde partie, le travail de thèse a identifié les cellules dendritiques conventionnelles (ou cDC), en particulier CD11b<sup>+</sup>, comme indispensables pour le développement de l'immunité adaptative systémique et muqueuse en réponse à l'instillation nasale d'un vaccin expérimental composé de flagelline et d'antigène. A nouveau, cette observation positionne les cDC comme des APC à cibler par les adjuvants muqueux de la vaccination.

Ce travail de thèse participe à la compréhension des mécanismes d'action des adjuvants et des vaccins. Pendant des décennies, l'utilisation des adjuvants vaccinaux a été guidée par leur capacité à induire une protection contre l'infection ciblée et par leur innocuité. Cette approche a longtemps été empirique mais elle se fonde désormais sur des connaissances approfondies sur l'immunité innée, l'immunité adaptative et leurs interactions. Les mécanismes cellulaires et moléculaires des adjuvants vaccinaux, qui ont longtemps été considérés comme "the dirty little secret" des immunologistes sont de mieux en mieux décrits et il est désormais possible d'en dresser un schéma de fonctionnement global (**Figure 31**). Les spécificités des adjuvants muqueux par rapport aux adjuvants de la vaccination systémique seront abordés dans cette discussion autour de 4 axes:

1. L'activation des cellules structurales par les adjuvants
2. Les mécanismes de transactivation des cellules dendritiques par les cellules structurales
3. Le découplage de la réponse inflammatoire et de la réponse adjuvante
4. Les mécanismes de programmation de la réponse adaptative muqueuse



**Figure 31 : Mode d'action général des adjuvants vaccinaux**

Au point d'injection, les adjuvants sont détectés par les cellules immunitaires innées telles que les PMN, les monocytes inflammatoires et les DC. En réponse à cette stimulation, les PMN et monocytes produisent des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines, amplifiant le recrutement de cellules sanguines. Les monocytes peuvent également se transdifférencier en DC inflammatoires (moDC). Les DC activées par les adjuvants deviennent quant à elles matures. De façon alternative, la maturation des DC peut s'effectuer de façon indirecte suite à l'activation de cellules stromales par l'adjuvant dans un processus de transactivation. Les DC (cDC ou moDC) capturent l'antigène et migrent dans les ganglions drainants où elles présentent l'antigène aux lymphocytes T et B naïfs. Cette activation, ainsi que la coopération entre les lymphocytes T et B activés, aboutit à la mise d'une réponse adaptative spécifique de l'antigène, caractérisée par la présence de lymphocytes T et B mémoires et de plasmocytes. D'après (Calabro, 2011; Didierlaurent, 2009; Garçon, 2011; Lambrecht, 2012; Makidon, 2012)

L'un des défis de la vaccinologie moderne consiste à identifier les corrélats de protection contre une infection et créer des vaccins stimulant efficacement un tel processus immunitaire. Un ensemble d'approches bioinformatiques et immunologiques, regroupées sous le nom de "System Biology", ont été développées afin de décrypter la succession d'évènements biologiques déclenchés par la vaccination et les adjuvants, et aboutissant à la protection d'un individu vacciné. Les agonistes TLR se prêtent parfaitement à ces analyses car leur activité biologique peut être tracée au contraire des adjuvants les plus répandus que sont l'alum ou le MF59. En effet, la signalisation TLR malgré sa complexité a des caractéristiques invariantes telles que l'activation des voies NF- $\kappa$ B, MAPK et IRF et la transcription de gènes cibles bien définis. Nos études sur l'administration nasale de flagelline ont révélé une réponse spécifique des cellules épithéliales respiratoires via TLR5 conduisant

## Discussion

ensuite à la transactivation des cellules dendritiques conventionnelles. Au contraire, la signalisation TLR5 au sein même des cDC ne semble pas ou peu requise pour l'activation fonctionnelle des cDC et l'effet adjuvant. La flagelline présente par ailleurs des caractéristiques intéressantes d'un point de vue pharmacocinétique. La protéine est biodégradable dans les muqueuses et induit une signalisation TLR5 transitoire accompagnée d'un retour rapide à l'homéostasie. Ainsi, la flagelline représente un excellent modèle d'étude pour décrypter le dialogue entre immunité innée et adaptative dans les muqueuses.

### **Contribution des cellules structurales à la réponse aux vaccins**

Nos travaux sur l'effet adjuvant muqueux de la flagelline ont mis en évidence le rôle majeur des cellules structurales dans l'induction de l'immunité adaptative. De façon remarquable, la flagelline est un motif microbien qui est spécifiquement exprimé au niveau des sites muqueux par de nombreuses bactéries pathogènes. A ce titre, elle représente un motif microbien unique pour les muqueuses. Dans nos études, la vaccination expérimentale avec la flagelline est totalement dépendante de TLR5 mais ne sollicite pas la voie de l'inflammasome, i.e. NLRC4. La signalisation TLR5 au sein des cellules épithéliales respiratoires récapitule la signature transcriptionnelle du tractus respiratoire au niveau des gènes différentiellement régulés et de la cinétique d'expression. Cette étude met en exergue le rôle des cellules épithéliales comme force motrice de l'effet adjuvant sur l'immunité adaptative. Des observations similaires ont été réalisées précédemment à nos travaux dans le contexte de pathologies muqueuses inflammatoires chroniques. Dans des modèles d'asthme allergique, il avait été montré que les cellules épithéliales pulmonaires au contact d'allergènes pouvaient stimuler l'induction de réponses Th2 qui provoquent la pathologie (Kool, 2012). L'activation stromale de TLR4 (mais aussi NOD1/NOD2) a été mise en évidence comme mécanisme d'induction des réponses Th2. De plus, ces travaux ont permis de définir que des médiateurs épithéliaux tels que les cytokines TSLP, IL-25, IL-33 et GM-CSF affecte la maturation fonctionnelle des APC. La signalisation induite par les allergènes sur les PRR au niveau épithélial associée à la stimulation directe des APC induit le développement des réponses Th2 pathologiques (Plantinga, 2013).

D'autres études ont rapporté une activité des adjuvants vaccinaux sur les cellules structurales, en particulier les cellules épithéliales. Par voie intranasale, l'effet d'une nanoémulsion (huile dans eau) sur les cellules épithéliales et des DC de la cavité nasale a été étudiée (Makidon, 2012). La nanoémulsion a été montrée comme activant directement les DC. *In vivo*, son administration induit la mort des cellules épithéliales par apoptose et nécrose, et stimule la production épithéliale de cytokines et de chimiokines (telles que l'IL-6, l'IL-12, le TSLP ou CXCL1). Ces travaux suggèrent une contribution des cellules épithéliales à l'effet adjuvant muqueux. De façon analogue à nos observations par voie muqueuse, l'activation de cellules structurales a également été observée pour des adjuvants injectés par

## Discussion

voie systémique. Ainsi, par voie intramusculaire, il a été établi que les fibres musculaires répondent au MF59 et au CpG, en produisant des protéines telles que l'opsonine Pentraxine 3 ou le régulateur JunB (Mosca, 2008). La localisation du MF59 dans les cellules structurales musculaires au point d'injection, suggère que ces cellules répondent directement à l'adjuvant. De plus, *in vivo* l'administration individuelle des composants du MF59 a montré une activité du Span85 sur la production de cytokines et de chimiokines par les cellules structurales (Calabro, 2013). Bien que le rôle exact des fibres musculaires dans la réponse adaptative du MF59 reste à déterminer, il est tentant de spéculer qu'une partie de la réponse adjuvante du MF59 résulte de l'activation de cellules stromales. De même Kool *et al.* ont supposé que la nécrose des cellules péritonéales induite par l'injection i.p. d'alum était à l'origine de la libération d'acide urique transactivant ensuite les DC (Kool, 2008). Marichal *et al.* ont démontré que l'effet adjuvant de l'alum par voie i.m. est également associé à sa capacité à induire la mort de cellules au site d'injection (Marichal, 2011). Bien que les cellules cibles n'aient pas été identifiées, l'hypothèse d'une action directe de l'alum sur les fibres musculaires et les cellules structurales du péritoine mériterait d'être analysé.

La toxine cholérique ou ses analogues qui représentent des adjuvants muqueux de référence chez la souris, sont connus pour leur ciblage des cellules épithéliales et des APC via le ganglioside GM1. Par voie orale seule l'activation GM1 sur les DC est nécessaire à l'obtention d'un effet adjuvant, tandis que la stimulation exclusive des cellules stromales est inopérante (Gustafsson, 2013). Cependant, la contribution des cellules structurales reste à évaluer par d'autres voies d'immunisation.

Le paradigme de l'utilisation des agonistes PRR en tant qu'adjuvant est que la réponse innée programme la réponse adaptative au sein des APC. Pour ces raisons, la recherche de nouveaux adjuvants est guidée par leur capacité à moduler l'activation du système immunitaire inné dans les APC. Les cellules structurales, en particulier les cellules épithéliales (pulmonaires et intestinales), les fibres musculaires, les fibroblastes ou les kératinocytes sont reconnues pour leur capacité à détecter des pathogènes via des PRR et à ensuite déclencher de fortes réponses innées (Abreu, 2010; Janot, 2009; Lambrecht, 2012). *In vivo*, la contribution des cellules épithéliales intestinales et respiratoires dans la stimulation de l'immunité innée a été validée par des expériences effectuées avec des souris déficientes chimère ou tissu-spécifique (Feuillet, 2006; Hammad, 2009; Nenci, 2007). De même, l'immunité innée muqueuse TLR5 à médiation s'est avérée dépendre de signalisation dans le compartiment de l'épithélium de la muqueuse (Didierlaurent, 2008; Janot, 2009). Au vu de l'ensemble de ces observations, le criblage des adjuvants (en particulier ceux stimulant les PRR) devrait tenir compte de la réponse innée des cellules structurales et de l'impact sur l'activation indirecte des APC.

### **Mécanismes de transactivation des APC par les cellules structurales**

## Discussion

Différentes études sur la signalisation muqueuse via les PRR ont rapporté que la transactivation des APC muqueuses, i.e. l'activation indirecte des APC par des médiateurs secondaires, est suffisante pour le déclenchement de réponses adaptatives (Hammad, 2009; Pang, 2013). A l'inverse, l'activation directe des PPR sur les APC ("PRR licensing") semble indispensable à l'induction de l'immunité adaptative humorale et cellulaire en réponse à l'administration systémique d'agonistes PRR (Joffre, 2009). Le mécanisme d'activation indirecte peut être enclenché par la stimulation PRR sur les cellules structurales ou la mort de ces cellules. Ainsi, dans le contexte de l'asthme, le GM-CSF, l'IL-33, l'IL-25 et le TSLP produits par des cellules épithéliales stimulent les DC à activer des réponses de type Th2 (Kool, 2012; Lambrecht, 2012 ; Willart, 2012). Dans le contexte grippal, l'IL-1 $\beta$  et/ou le GM-CSF produits par les cellules épithéliales pulmonaires infectées par les virus stimulent des réponses cellulaires CD8 et Th1 (Pang, 2013; Unkel, 2012). Dans le contexte de vaccination muqueuse, la production de CCL20 stimule le recrutement d'APC, en particulier monocytes et DC, puis l'induction de réponse T CD8 (Le Borgne, 2006) (Anjuere, 2004; Pichavant, 2006). Nos travaux sur la flagelline semblent indiquer que les cytokines IL-25, IL-33 et TSLP ne sont pas essentielles à l'effet adjuvant car ces cytokines ne sont pas modulées au niveau transcriptionnel par la flagelline. De même, la contribution de l'IL-1 $\beta$  a été rejetée car la flagelline même si elle stimule effectivement la synthèse d'ARNm spécifique de la forme pro-IL-1 $\beta$  n'active pas la maturation en IL-1 $\beta$  au sein du tractus respiratoire. Même si la flagelline induit une forte production locale de CCL20 (article 1) (Didierlaurent, 2008; Nempont, 2008), nous n'avons pas constaté d'augmentation significative du nombre DC dans les voies respiratoires, ce qui suggère que CCL20 dans ce contexte n'est pas lié à la migration des précurseurs de DC du sang vers le poumon. Notre hypothèse est que CCL20 participe au recrutement de cellules lymphoïdes innées de type 3, de lymphocytes Th17 ou de Treg (Kang, 2009; Van Maele, 2010; Wang, 2009; Zygmunt, 2009). Finalement, la contribution du GM-CSF à la transactivation reste à éprouver malgré que son activité soit préférentiellement ciblée sur les monocytes et les MoDC qui ne participe pas ou peu à l'effet de la flagelline.

Les protéines du complément C5a et C3 ont été montrés comme principe actif de la maturation et la migration de DC pulmonaires respectivement dans des modèles d'asthme et d'infection grippale (Kandasamy, 2013; Schudde, 2013). Bien que les mécanismes de production des protéines du complément n'aient pas été étudiés, la production de C3 par des cellules épithéliales intestinales stimulées par l'IL-1 $\beta$  a été rapportée par ailleurs (Moon, 1999). De façon notable, la signature pulmonaire spécifique de la flagelline a mis en évidence une activation de la fonction associée au système du complément (résultats non montrés). Ainsi l'expression des gènes codant C1R, C4A/C4B, C3, C5AR1, C1S, CFB, et C3AR1 est significativement augmentée 4h post-vaccination. La contribution des molécules du complément dans la transactivation des cDC reste totalement à explorer.



## Discussion

L'analyse transcriptomique du poumon suggère également un rôle potentiel des médiateurs lipidiques dans l'effet adjuvant. En effet, la transcription des enzymes permettant la synthèse de la prostaglandine E2 (PTGS2 et PTGES) est activée par la flagelline. Bien que ses effets sur l'immunité soient pléiotropes, la prostaglandine E2 a été montrée comme permettant l'activation et la migration de cellules de Langerhans via sa signalisation par le récepteur EP4 (Kabashima *et al.* Nat Med, 2003). De même, la flagelline induit l'activation transcriptionnelle de deux enzymes impliquées dans le métabolisme des oxystérols : la CH25H et le CYP7B1. Récemment cette synthèse d'oxystérols par les cellules stromales ganglionnaires a été reliée à la réponse humorale. D'autre part la CH25H a été rapportée comme activée par des stimulation TLR ou par des IFN de type I dans les macrophages et les DC. De plus, l'induction de nombreux gènes impliqués dans la voie de signalisation des interférons de type I ainsi que de nombreux gènes de défense antivirale a retenu notre attention dans l'analyse microarray. Il est remarquable qu'un composé bactérien active significativement ces voies spécifiques de la réponse anti-virale. La participation de ces effecteurs antiviraux et de leurs voies de signalisation (telle IRF7) reste à étudier dans l'effet adjuvant muqueux de la flagelline.

Au laboratoire, nous développons actuellement un modèle *in vitro* de cellules primaires associant des cellules épithéliales respiratoires murines ("mouse tracheal epithelial cells") à des cellules dendritiques conventionnelles (dérivées en Flt3L). Ce modèle simplifié va permettre de réaliser un criblage à moyen débit du(des) médiateur(s) épithélial(aux) produit(s) par la stimulation TLR5 et responsable(s) de la transactivation des cDC. En effet, un tel modèle apporte la possibilité d'évaluer la contribution de médiateurs candidats par des techniques d'interférence ARN, d'inhibiteurs spécifiques et/ou d'anticorps neutralisants. La mise en place du modèle de culture primaire présente également un intérêt pour l'étude des interactions entre l'épithélium activé par la flagelline et des cellules immunitaires innées telles que les PMN ou les macrophages alvéolaires. Enfin la mise en évidence d'un ou plusieurs médiateurs épithéliaux responsables de la transactivation des DC constituera une avancé essentielle pour poursuivre les recherches sur la flagelline et de nouveaux adjuvants muqueux. En particulier ces médiateurs épithéliaux transactivant les DC pourront être développées comme nouveaux adjuvants muqueux ou comme biomarqueurs. En plus de la vaccination muqueuse, la contribution de la signalisation des adjuvants au travers des cellules structurales pour des voies d'administration intramusculaire ou sous-cutanée reste à revisiter car la plupart des adjuvants utilisés par ces voies ont été évalués pour leurs effets sur les APC. Une telle analyse pourrait conduire à reconsidérer le mécanisme d'action de certains adjuvants déjà commercialisés ou en développement clinique.

Parallèlement aux mécanismes de transactivation des APC impliquées dans l'effet des adjuvants, reste à déterminer la nature même de ces APC. Le profil cellulaire induits par les adjuvants est généralement caractérisé par l'infiltration de cellules dendritiques, de monocytes

## Discussion

et de PMN. Si l'activité des PMN dans la présentation antigénique semble être fréquemment exclue pour l'activité des adjuvants vaccinaux, le rôle des monocytes, DC et moDC n'est pas toujours simple à évaluer en partie à cause de manque de marqueurs phénotypiques pour différencier ces cellules. Les monocytes et/ou moDC ont été identifiées comme cruciaux dans l'induction ou la modulation de réponses Th1 (Boring, 1997; Peters, 2000). L'implication des cDC et moDC dans les réponses adaptatives a été particulièrement bien décrit dans l'asthme (Plantinga, 2013). Ainsi les moDC ont été associés à la stimulation des réponses T lors de la phase de challenge allergénique. A l'inverse les cDC sont majoritairement impliquées dans le priming des lymphocytes CD4 lors de la phase de sensibilisation. Dans un contexte d'infection génitale avec le virus de l'herpès, les monocytes inflammatoires de la muqueuse vaginale sont importants pour stimuler les lymphocytes Th1 provenant des ganglions dans le site infecté (Iijima, 2011). Dans le contexte d'administration systémique d'adjuvants vaccinaux, les monocytes et/ou moDC exercent une influence sur la réponse T directement au site d'injection et dans les ganglions drainants, mais ils ne sont pas indispensables pour le priming proprement dit (Langlet, 2012). De même, dans un modèle d'infection cutanée à *Leishmania major*, les souris *Ccr2*<sup>-/-</sup> sont plus susceptibles à l'infection, car les réponses Th1 impliquées dans la clairance du pathogène ne peuvent être mises en place (Serbina, 2008). Grâce à l'utilisation de souris *Ccr2*<sup>-/-</sup>, de liposomes chargés en clodronate et de déplétion des cellules exprimant CD11c, nos travaux ont permis de définir que (1) les monocytes et moDC ne participent à l'effet adjuvant muqueux et (2) les cDC ont un rôle essentiel. Ces données sont cohérentes avec les résultats obtenus dans l'asthme, i.e. un rôle majeur des cDC dans la sensibilisation de la réponse adaptative.

Le rôle des moDC peut être associé à leur similarité fonctionnelle avec les macrophages. En effet les macrophages se caractérisent par une forte activité phagocytaire et une production élevée de cytokines, mais une faible capacité de migration dans les ganglions (Mosser, 2008; Schlitzer, 2013). L'activation de macrophages peut conduire à une activité immunosuppressive ou tolérogénique favorisant une réponse Treg (Kang, 2008; Zheng, 2013). A l'inverse, les macrophages peuvent influencer la différenciation Th1 et Th17 au travers de cytokines telles que l'IL-23, IL-1 et/ou IL-6 (Mosser, 2008). Les macrophages constituent ainsi des cibles intéressantes dans la modulation de réponses T en vaccination (Stout, 2005) (Macdonald, 2013). Bien que les mécanismes de présentation antigénique et/ou de sécrétion de cytokines n'aient pas été complètement élucidés, cette approche est très intéressante pour le développement de vaccins protégeant les muqueuses.

L'effet adjuvant muqueux que nous avons observé avec la flagelline soluble est dépendant de TLR5. L'activation de l'inflammasome NLRC4 est dépendante de l'entrée de la flagelline dans le cytosol, par exemple suite à son injection intracellulaire par des systèmes de sécrétion bactériens. Selon la théorie du danger, la production d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 par l'inflammasome reflète un danger supérieur à l'activation TLR5 seule. Il est donc probable

## Discussion

que les réponses immunitaires adaptatives soient différentes dans le cas d'une activation TLR5 et NLCR4 comparativement à l'activation TLR5 seule. Une étude similaire à celle déjà effectuée avec la flagelline soluble pourrait être effectuée avec de la flagelline formulée au sein de liposomes ou d'émulsions qui faciliterait la délivrance cytosolique de l'adjuvant ainsi que la délivrance transépithéliale. Ces formulations permettraient d'établir un lien entre les récepteurs de l'immunité innée, la nature des cellules cibles de cette immunité, la migration des différentes populations de DC pulmonaires et le type de réponse T générée. Une étude récente a identifié que les moDC pulmonaires expriment plus fortement TLR5 que les cDC pulmonaires (Schlitzer, 2013). Le passage de la flagelline dans le parenchyme pulmonaire pourrait donc stimuler l'activation des moDC, de façon concomitante à la transactivation des cDC. Dans ce contexte les moDC pourraient participer à la modulation de l'immunité adaptative au niveau des ganglions drainants mais aussi au niveau local après relocalisation des lymphocytes effecteurs. Dans différents modèles, il a été montré une induction préférentielle de réponses Th17 par les cDC CD11b<sup>+</sup> pulmonaires (Zygmunt, 2009). Au vu de la plasticité de ces lymphocytes il serait intéressant de comparer dans le modèle flagelline le phénotype des lymphocytes Th dans les ganglions drainants puis dans le poumon après leur adressage. La contribution des différentes APC pulmonaires dans cette seconde phase reste également à explorer.

### **Découplage de la réponse inflammatoire et de la réponse adaptative dans la vaccination**

Afin d'établir une signature de l'activité adjuvante de nouveaux composés et mieux comprendre leur mode d'action, les changements cellulaires et moléculaires induits par les adjuvants systémiques et muqueux ont été étudiés (Didierlaurent, 2009; Makidon, 2012; Morel, 2011; Mosca, 2008; Reimer, 2012). Le recrutement de cellules inflammatoires CD11b<sup>+</sup> telles que les PMN et les monocytes inflammatoires a en général été observé corrélant avec la signature transcriptionnelle qui révèle les fonctions biologiques liés à la réponse de phase aiguë et à la production de chimiokines. En établissant la signature moléculaire des adjuvants CpG, alum et MF59 administrés par voie i.m., Mosca et al. ont identifié 168 gènes communément induits et impliqués dans les interactions des cytokines avec leur récepteur, dans le recrutement cellulaire ou encore dans la défense anti-virale (Mosca, 2008). De façon surprenante, notre analyse par microarrays visant à étudier les gènes induits par la flagelline dans le poumon ou la peau a révélé une induction de fonctions similaires ainsi que de nombreux gènes communs. De plus, elle s'est révélée très similaire à l'analyse transcriptionnelle des adjuvants CpG et  $\alpha$ -galactosylcéramide dans la muqueuse vaginale (Lindqvist, 2011). Les différents adjuvants étudiés induisent localement une forte réponse inflammatoire, des processus de chimiotaxie ou encore la production de cytokines et chimiokines. Cependant l'impact de ces gènes sur la réponse adaptative n'est pas déterminé.

## Discussion

Bien qu'ils ne soient pas classiquement considérés comme des APC, certains auteurs ont suggéré que les PMN pourraient exercer des fonctions de modulation voire d'induction des réponses T. Par exemple, lors de réactions inflammatoires, les PMN activés peuvent recruter et transactiver des DC et des monocytes, et plus tardivement y attirer les lymphocytes T (Nathan, 2006; van Gisbergen, 2005). Enfin il a été proposé que les PMN puissent migrer au niveau ganglionnaire via l'expression de CCR7, mais aussi présenter l'antigène et induire des réponses T cytotoxiques *in vitro* et *in vivo* (Beauvillain, 2011; Beauvillain, 2007; Culshaw, 2008; Duffy, 2012). Cependant, notre étude sur l'administration muqueuse de flagelline (Article 2), et l'étude de Calabro *et al.* (Calabro, 2011) sur l'effet systémique du MF59 ont mis en évidence que le recrutement de PMN ne participe pas de façon déterminante à de l'effet adjuvant.

Le recrutement local de monocytes inflammatoires puis leur transdifférenciation en DC a été avancé afin d'expliquer l'effet adjuvant du MF59, mais l'impact de ces cellules sur la présentation antigénique et l'activation des lymphocytes T n'a pas été analysé (De Gregorio, 2009; O'Hagan, 2012). Il en est de même pour l'AS03 où l'antigène est activement transporté dans les ganglions drainants par les DC et les monocytes (Morel, 2011), mais la fonction de ces cellules dans l'effet adjuvant n'a pas été déterminé. Dans le contexte de la vaccination nasale avec la flagelline, les monocytes n'ont pas montré de réelle contribution à l'effet adjuvant.

L'ensemble de ces observations suggère que la composante inflammatoire des adjuvants, i.e. les PMN et monocytes pourrait être découplée de l'activité adjuvante proprement dite. Le découplage de ces deux activités présente un intérêt car les processus inflammatoires excessifs sont souvent associés à des pathologies (lors d'une stimulation permanente et/ou lorsque les mécanismes de rétro-contrôle ne sont pas fonctionnels). Ainsi, le recrutement incontrôlé de cellules pro-inflammatoires telles que les PMN, les monocytes et/ou les moDC peut s'avérer délétère et être à l'origine de dommages tissulaires irréversibles. Par exemple, dans l'asthme, les moDC massivement recrutées dans le tissu pulmonaire lors de la phase de challenge, ont été identifiées comme une source de chimiokines recrutant des polynucléaires éosinophiles (Plantinga, 2013). Ces phénomènes semblent inopérants dans le cadre de l'effet adjuvant muqueux de la flagelline. Malgré que la flagelline induise une forte réponse pro-inflammatoire dépendante de NF- $\kappa$ B dans le poumon, son caractère est transitoire. Notre analyse a surtout révélé une augmentation rapide de l'expression de gènes codant des régulateurs négatifs tels que A20, ZFP36, I $\kappa$ -B $\alpha$  et ATF3. Ces régulateurs agissent tout au long de la voie de signalisation TLR, bloquant ainsi les réponses pro-inflammatoires intempestives ou prolongées. Outre la régulation de la signalisation, la capacité d'un adjuvant à induire une restauration rapide de l'homéostasie est une qualité importante. Il est intéressant de noter que l'instillation de flagelline de gènes active également l'expression de gènes responsables de la réparation cellulaire comme le facteur de croissance amphiréguline, la

## Discussion

protéine de réparation de l'ADN GADD45 $\beta$  ou le facteur GDF15 de la famille de TGF- $\beta$ . Ainsi la balance entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires mais aussi l'induction de protéines de réparation tissulaire permettent d'assurer une bonne induction de l'immunité adaptative spécifique tout en évitant la survenue de dommages tissulaires.

Notre étude a également démontré que la vaccination nasale ne nécessite pas l'inflammasome NLRC4, une composante potentiellement inflammatoire. L'activation concomitante de TLR5 et de NLRC4 par la flagelline est une stratégie potentiellement intéressante pour manipuler les réponses Th1 et Th17. Ainsi, des études ont montré que la production d'IL-18 et d'IL-12 stimule des réponses Th1 tandis que l'IL-1 $\beta$  et l'IL-23 stimule des réponses Th17 (Dostert, 2013). La flagelline délivrée par voie systémique est capable d'activer via NLRC4 la production d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T CD8 mémoires de façon TCR-indépendante (Kupz, 2012). Cette activation requiert la production d'IL-18 par les DC spléniques. Ce processus est complètement indépendant de l'activation TLR5 et de systèmes de sécrétion de type III pour l'injection cytosolique de flagelline. Le lien entre l'activation de l'inflammasome et l'activation fonctionnelle des lymphocytes CD8 a également été démontré dans le cadre d'infections avec le virus west-nile (Freeman, 2012; Ramos, 2012). Ainsi, la stimulation de l'inflammasome NLRC4 par la flagelline bien qu'inflammatoire peut conduire à l'extension des propriétés adjuvantes.

### **Programmation de la réponse immunitaire muqueuse et systémique et adressage muqueux**

Les réponses immunitaires muqueuses sont caractérisées par la production d'IgA sécrétoires et la relocalisation des lymphocytes B et T dans les muqueuses. Ces caractéristiques sont intimement dépendantes des DC muqueuses. L'acide rétinoïque et le TGF- $\beta$  sont nécessaires aux DC des poumons et des MLN pour induire l'expression de CCR4 sur les lymphocytes et promouvoir leur domiciliation dans la muqueuse pulmonaire (Mikhak, 2013). De façon surprenante, ces mêmes DC stimulent l'expression de CCR9 et  $\alpha 4\beta 7$  sur les lymphocytes T et une domiciliation dans la muqueuse intestinale (Ruane, 2013). Cette propriété du système immunitaire muqueux commun s'appuie sur une domiciliation des lymphocytes dans différentes muqueuses imposée par les APC muqueuses. L'influence du mode d'activation des DC (par exemple avec ou sans adjuvant, ou avec un adjuvant pro-Th1 ou pro-Th2) ainsi que des facteurs produits par les DC dans l'induction de CCR4 et/ou CCR9 sur les cellules T n'est pas totalement élucidé, mais sera d'intérêt dans le design de vaccins muqueux. De plus, différentes études ont suggéré que les DC pulmonaires activent les lymphocytes T au niveau des ganglions drainants (MdLN), puis les lymphocytes T activés migrent dans la muqueuse intestinale de façon plus tardive (Lambrecht, 2000; Ruane, 2013). Plus récemment, la migration des APC muqueuses d'un site vers un autre a été proposée comme mécanisme de domiciliation des lymphocytes au sien du système immunitaire

## Discussion

muqueux commun. De façon intéressante, lors d'immunisations sublinguales, la présence de lymphocytes CD8 activés dans la rate ou dans des des ganglions ne drainants pas la muqueuse d'administration vaccinale a été associée à la migration de DC dans ces sites distants (Hervouet, 2013).

Les mécanismes spécifiques d'induction de la production d'IgA par les DC muqueuses impliquent notamment la capacité à métaboliser l'acide rétinoïque et à produire du TGF- $\beta$  (Gloudemans, 2013). Les DC systémiques et muqueuses ayant une origine ontogénique commune, il serait intéressant d'étudier les fondements de ces différences phénotypiques et fonctionnelles. Il a été proposé que l'acide rétinoïque produit dans la moelle osseuse influence de façon précoce la différenciation des DC vers un phénotype muqueux (expression de CCR9 et de RALDH) et leur localisation dans la muqueuse intestinale (Feng, 2010). A l'inverse l'environnement pulmonaire et/ou muqueux pourrait également intervenir de façon plus tardive dans l'expression différentielle des TLR et des récepteurs aux facteurs de transactivation des DC. La recherche des caractéristiques spécifiques des cDC pulmonaires comparativement aux cDC spléniques pourrait ainsi conduire à la compréhension des mécanismes de programmation de la réponse muqueuse.

In vivo les DC CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> de la lamina propria répondent spécifiquement à la stimulation directe de TLR5 et provoquent ainsi la différenciation de lymphocytes B naïfs en plasmocytes sécréteurs d'IgA de façon T-indépendante (Uematsu, 2008). Ce processus nécessite que les DC stimulées produisent l'IL-6 mais aussi l'acide rétinoïque et stimulent la différenciation Th17 des lymphocytes. Une conclusion similaire a été effectuée dans l'infection pulmonaire à *Legionella pneumophila* induisant préférentiellement des réponses Th1/Th17 (Trunk, 2012). En effet, l'absence de stimulation TLR5 résulte en une perte de la composante Th17 dans les muqueuses. Finalement, des études récentes ont montré que les DC intestinales et systémiques en réponse à l'interaction flagelline-TLR5 produisent rapidement de l'IL-23 qui transactivent alors des cellules lymphoïdes innées de type 3 à produire transitoirement les cytokines de la famille IL-17 et l'IL-22 (Kinnebrew, 2012; Van Maele, 2010). L'empreinte de cette réponse sur l'immunité adaptative sera importante à explorer pour caractériser l'immunomodulation muqueuse des agonistes PRR.

Un autre moyen de moduler les réponses immunitaires adaptatives aux adjuvants muqueux consiste à modifier la formulation. Cette stratégie a été testée dans un modèle de vaccin contre la tuberculose utilisant un agoniste synthétique de TLR4 en suspension aqueuse ou formulé. La formulation de l'adjuvant dans une émulsion huile dans eau confère une bonne induction de réponses Th1 et est associée à une meilleure élimination de *Mycobacterium tuberculosis* dans les poumons et la rate (Fox, 2013; Orr, 2013). Des stratégies peuvent être développées pour favoriser la cross-présentation. La formulation de l'antigène dans des particules peut augmenter sa capture et sa présentation aux lymphocytes CD8. L'induction d'IFN de type I, soit par activation des pDC, soit par l'activation TLR-3, -7, -9 dans les cDC

## Discussion

peut aussi favoriser la cross-présentation (Foged, 2012). Enfin l'adressage de l'antigène aux DC CD8 par le ciblage de récepteurs fortement exprimés par ces cellules tels que CD205 (DEC-205), CD207 (langérine) ou CLEC9A (DNGR-I) est une approche très prometteuse (Idoyaga, 2011). En particulier, CLEC9A a été identifié comme un marqueur des DC CD8 murines et humaines reconnaissant les cellules nécrotiques (Poulin, 2012). Son ciblage favorise la présentation d'antigènes par le MHCI, et donc l'induction de réponses cytotoxiques protectrices lors d'infection virales (Caminschi, 2008; Zelenay, 2012).

Dans ce travail, nous avons observé que la réponse anticorps stimulée par la flagelline était remarquablement persistante. Les mécanismes responsables de cette réponse mémoire devraient être étudiés. En particulier le développement des lymphocytes T et B mémoires ainsi que celui des T<sub>FH</sub> induits par certains adjuvants a été avancé dans certains modèles (Moon, 2012). De même le lien entre les lymphocytes Th17, T<sub>FH</sub> et la production d'IgA, mis en évidence dans les plaques de Peyer, pourrait également se dérouler suite à une immunisation par voie intranasale (Hirota, 2013). Dans ce but, il serait intéressant d'utiliser des antigènes modèles permettant de déterminer *in vivo* la localisation, la dynamique et les caractéristiques fonctionnelles et mémoires des lymphocytes T et B. Pour la réponse CD4, il est envisageable d'utiliser un antigène de fusion avec le peptide CD4 2W1S et l'antigène Ovalbumine pour lesquels des tétramères sont disponibles. Pour la réponse B, l'utilisation d'un antigène fluorescent permettrait de telles investigations.

Plus généralement, ce travail de thèse amène à considérer que la vaccination et les adjuvants impactent non seulement les APC qui vont promouvoir les réponses lymphocytaires mais également l'environnement au site d'injection du vaccin et au site de drainage de ce vaccin. Bien que cette observation ait été réalisée dans un seul modèle par administration muqueuse, elle ouvre des perspectives plus générales concernant la vaccination et les méthodes d'analyse de l'efficacité vaccinale.

## Références bibliographiques

---



## Références bibliographiques

- Abreu, M. T. (2010). "Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function." *Nat Rev Immunol* 10(2): 131-144.
- Agace, W. W. (2008). "T-cell recruitment to the intestinal mucosa." *Trends Immunol* 29(11): 514-522.
- Aggarwal, S., N. Ghilardi, et al. (2003). "Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17." *J Biol Chem* 278(3): 1910-1914.
- Agrawal, S., A. Agrawal, et al. (2003). "Cutting Edge: Different Toll-Like Receptor Agonists Instruct Dendritic Cells to Induce Distinct Th Responses via Differential Modulation of Extracellular Signal-Regulated Kinase-Mitogen-Activated Protein c-Fos." *J Immunol* 171(10): 4984-4989.
- Akashi, S., S. Saitoh, et al. (2003). "Lipopolysaccharide interaction with cell surface Toll-like receptor 4-MD-2: higher affinity than that with MD-2 or CD14." *J Exp Med* 198(7): 1035-1042.
- Akira, S. and K. Takeda (2004). "Toll-like receptor signalling." *Nat Rev Immunol* 4(7): 499-511.
- Aldridge, J. R., Jr., C. E. Moseley, et al. (2009). "TNF/iNOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(13): 5306-5311.
- Alvarez, D., E. H. Vollmann, et al. (2008). "Mechanisms and consequences of dendritic cell migration." *Immunity* 29(3): 325-342.
- Amorij, J. P., G. F. Kersten, et al. (2012). "Towards tailored vaccine delivery: needs, challenges and perspectives." *J Control Release* 161(2): 363-376.
- Andersen-Nissen, E., K. D. Smith, et al. (2005). "Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(26): 9247-9252.
- Andre, F. E. (2003). "Vaccinology: past achievements, present roadblocks and future promises." *Vaccine* 21(7-8): 593-595.
- Anjuere, F., C. Luci, et al. (2004). "In vivo adjuvant-induced mobilization and maturation of gut dendritic cells after oral administration of cholera toxin." *J Immunol* 173(8): 5103-5111.
- Arend, W. P., G. Palmer, et al. (2008). "IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines." *Immunol Rev* 223: 20-38.
- Arestides, R. S., H. He, et al. (2002). "Costimulatory molecule OX40L is critical for both Th1 and Th2 responses in allergic inflammation." *Eur J Immunol* 32(10): 2874-2880.
- Ather, J. L., K. Ckless, et al. (2011). "Serum amyloid A activates the NLRP3 inflammasome and promotes Th17 allergic asthma in mice." *J Immunol* 187(1): 64-73.
- Bachmann, M. F. and G. T. Jennings (2010). "Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns." *Nat Rev Immunol* 10(11): 787-796.
- Bals, R. and P. S. Hiemstra (2004). "Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens." *Eur Respir J* 23(2): 327-333.
- Bargieri, D. Y., D. S. Rosa, et al. (2008). "New malaria vaccine candidates based on the Plasmodium vivax Merozoite Surface Protein-1 and the TLR-5 agonist Salmonella Typhimurium FliC flagellin." *Vaccine* 26(48): 6132-6142.
- Barletta, K. E., R. E. Cagnina, et al. (2012). "Leukocyte compartments in the mouse lung: distinguishing between marginated, interstitial, and alveolar cells in response to injury." *J Immunol Methods* 375(1-2): 100-110.
- Bates, J. T., A. H. Graff, et al. (2011). "Enhanced antigen processing of flagellin fusion proteins promotes the antigen-specific CD8+ T cell response independently of TLR5 and MyD88." *J Immunol* 186(11): 6255-6262.

## Références bibliographiques

- Bates, J. T., S. Uematsu, et al. (2009). "Direct stimulation of tlr5+/+ CD11c+ cells is necessary for the adjuvant activity of flagellin." *J Immunol* 182(12): 7539-7547.
- Beauvillain, C., P. Cunin, et al. (2011). "CCR7 is involved in the migration of neutrophils to lymph nodes." *Blood* 117(4): 1196-1204.
- Beauvillain, C., Y. Delneste, et al. (2007). "Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo." *Blood* 110(8): 2965-2973.
- Bemark, M., P. Bergqvist, et al. (2011). "A unique role of the cholera toxin A1-DD adjuvant for long-term plasma and memory B cell development." *J Immunol* 186(3): 1399-1410.
- Benko, S., D. J. Philpott, et al. (2008). "The microbial and danger signals that activate Nod-like receptors." *Cytokine* 43(3): 368-373.
- Besnard, A. G., N. Guillou, et al. (2011). "NLRP3 inflammasome is required in murine asthma in the absence of aluminum adjuvant." *Allergy* 66(8): 1047-1057.
- Blander, J. M. and R. Medzhitov (2006). "Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells." *Nature* 440(7085): 808-812.
- Blander, J. M. and L. E. Sander (2012). "Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat." *Nat Rev Immunol* 12(3): 215-225.
- Blomhoff, R. and H. K. Blomhoff (2006). "Overview of retinoid metabolism and function." *J Neurobiol* 66(7): 606-630.
- Bomsel, M., D. Tudor, et al. (2011). "Immunization with HIV-1 gp41 subunit virosomes induces mucosal antibodies protecting nonhuman primates against vaginal SHIV challenges." *Immunity* 34(2): 269-280.
- Boring, L., J. Gosling, et al. (1997). "Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice." *J Clin Invest* 100(10): 2552-2561.
- Boyaka, P. N. and J. R. McGhee (2001). "Cytokines as adjuvants for the induction of mucosal immunity." *Adv Drug Deliv Rev* 51(1-3): 71-79.
- Boyce, T. G., H. H. Hsu, et al. (2000). "Safety and immunogenicity of adjuvanted and unadjuvanted subunit influenza vaccines administered intranasally to healthy adults." *Vaccine* 19(2-3): 217-226.
- Bradney, C. P., G. D. Sempowski, et al. (2002). "Cytokines as adjuvants for the induction of anti-human immunodeficiency virus peptide immunoglobulin G (IgG) and IgA antibodies in serum and mucosal secretions after nasal immunization." *J Virol* 76(2): 517-524.
- Brandl, K., G. Plitas, et al. (2007). "MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII gamma and protect mice against intestinal *Listeria monocytogenes* infection." *J Exp Med* 204(8): 1891-1900.
- Brandtzaeg, P. (2007). "Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces." *Vaccine* 25(30): 5467-5484.
- Brandtzaeg, P. (2009). "Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions." *Scand J Immunol* 70(6): 505-515.
- Brandtzaeg, P., H. Kiyono, et al. (2008). "Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue." *Mucosal Immunol* 1(1): 31-37.
- Broz, P. and D. M. Monack (2013). "Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens." *Nat Rev Immunol* 13(8): 551-565.
- Calabro, S., M. Tortoli, et al. (2011). "Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes." *Vaccine* 29(9): 1812-1823.

## Références bibliographiques

- Calabro, S., E. Tritto, et al. (2013). "The adjuvant effect of MF59 is due to the oil-in-water emulsion formulation, none of the individual components induce a comparable adjuvant effect." *Vaccine* 31(33): 3363-3369.
- Caminschi, I., A. I. Proietto, et al. (2008). "The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement." *Blood* 112(8): 3264-3273.
- Caproni, E., E. Tritto, et al. (2012). "MF59 and Pam3CSK4 boost adaptive responses to influenza subunit vaccine through an IFN type I-independent mechanism of action." *J Immunol* 188(7): 3088-3098.
- Cash, H. L., C. V. Whitham, et al. (2006). "Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin." *Science* 313(5790): 1126-1130.
- Cerutti, A., K. Chen, et al. (2011). "Immunoglobulin responses at the mucosal interface." *Annu Rev Immunol* 29: 273-293.
- Chadwick, S., C. Kriegel, et al. (2010). "Nanotechnology solutions for mucosal immunization." *Adv Drug Deliv Rev* 62(4-5): 394-407.
- Chaudhuri, N. and I. Sabroe (2008). "Basic science of the innate immune system and the lung." *Paediatr Respir Rev* 9(4): 236-242.
- Chen, G., M. H. Shaw, et al. (2009). "NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease." *Annu Rev Pathol* 4: 365-398.
- Chen, K. W. and K. Schroder (2013). "Antimicrobial functions of inflammasomes." *Curr Opin Microbiol*.
- Cheong, C., I. Matos, et al. (2010). "Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas." *Cell* 143(3): 416-429.
- Chioato, A., E. Nosedà, et al. (2010). "Influenza and meningococcal vaccinations are effective in healthy subjects treated with the interleukin-1 beta-blocking antibody canakinumab: results of an open-label, parallel group, randomized, single-center study." *Clin Vaccine Immunol* 17(12): 1952-1957.
- Coffman, R. L., A. Sher, et al. (2010). "Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work." *Immunity* 33(4): 492-503.
- Coomes, J. L. and F. Powrie (2008). "Dendritic cells in intestinal immune regulation." *Nat Rev Immunol* 8(6): 435-446.
- Couch, R. B. (2004). "Nasal vaccination, Escherichia coli enterotoxin, and Bell's palsy." *N Engl J Med* 350(9): 860-861.
- Couturier-Maillard, A., T. Secher, et al. (2013). "NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer." *J Clin Invest* 123(2): 700-711.
- Crotty, S. (2011). "Follicular helper CD4 T cells (TFH)." *Annu Rev Immunol* 29: 621-663.
- Culshaw, S., O. R. Millington, et al. (2008). "Murine neutrophils present Class II restricted antigen." *Immunol Lett* 118(1): 49-54.
- Dauvilliers, Y., I. Arnulf, et al. (2013). "Increased risk of narcolepsy in children and adults after pandemic H1N1 vaccination in France." *Brain* 136(Pt 8): 2486-2496.
- De Gregorio, E., U. D'Oro, et al. (2009). "Immunology of TLR-independent vaccine adjuvants." *Curr Opin Immunol* 21(3): 339-345.
- del Rio, M. L., G. Bernhardt, et al. (2010). "Development and functional specialization of CD103+ dendritic cells." *Immunol Rev* 234(1): 268-281.
- Desch, A. N., P. M. Henson, et al. (2013). "Pulmonary dendritic cell development and antigen acquisition." *Immunol Res* 55(1-3): 178-186.
- Desch, A. N., G. J. Randolph, et al. (2011). "CD103+ pulmonary dendritic cells preferentially acquire and present apoptotic cell-associated antigen." *J Exp Med* 208(9): 1789-1797.
- Desreumaux, P., A. Foussat, et al. (2012). "Safety and efficacy of antigen-specific regulatory T-cell therapy for patients with refractory Crohn's disease." *Gastroenterology* 143(5): 1207-1217 e1201-1202.

## Références bibliographiques

- Didierlaurent, A., I. Ferrero, et al. (2004). "Flagellin promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2-type response." *J Immunol* 172(11): 6922-6930.
- Didierlaurent, A., J. Goulding, et al. (2008). "Sustained desensitization to bacterial Toll-like receptor ligands after resolution of respiratory influenza infection." *J Exp Med* 205(2): 323-329.
- Didierlaurent, A. M., S. Morel, et al. (2009). "AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity." *J Immunol* 183(10): 6186-6197.
- Dinarello, C. A. (2009). "Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family." *Annu Rev Immunol* 27: 519-550.
- Divanovic, S., A. Trompette, et al. (2005). "Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by the Toll-like receptor homolog RP105." *Nat Immunol* 6(6): 571-578.
- Dixit, E. and J. C. Kagan (2013). "Intracellular pathogen detection by RIG-I-like receptors." *Adv Immunol* 117: 99-125.
- Dominguez, P. M. and C. Ardavin (2010). "Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation." *Immunol Rev* 234(1): 90-104.
- Dormitzer, P. R., G. Galli, et al. (2011). "Influenza vaccine immunology." *Immunol Rev* 239(1): 167-177.
- Dostert, C., K. Ludigs, et al. (2013). "Innate and adaptive effects of inflammasomes on T cell responses." *Curr Opin Immunol* 25(3): 359-365.
- Draper, E., S. L. Bissett, et al. (2013). "A randomized, observer-blinded immunogenicity trial of Cervarix((R)) and Gardasil((R)) Human Papillomavirus vaccines in 12-15 year old girls." *PLoS One* 8(5): e61825.
- Du, X., A. Poltorak, et al. (2000). "Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution." *Eur Cytokine Netw* 11(3): 362-371.
- Duffy, D., H. Perrin, et al. (2012). "Neutrophils transport antigen from the dermis to the bone marrow, initiating a source of memory CD8+ T cells." *Immunity* 37(5): 917-929.
- Dupuis, M., K. Denis-Mize, et al. (2001). "Immunization with the adjuvant MF59 induces macrophage trafficking and apoptosis." *Eur J Immunol* 31(10): 2910-2918.
- Eaves-Pyles, T., H. F. Bu, et al. (2011). "Luminal-applied flagellin is internalized by polarized intestinal epithelial cells and elicits immune responses via the TLR5 dependent mechanism." *PLoS One* 6(9): e24869.
- Egea, L., Y. Hirata, et al. (2010). "GM-CSF: a role in immune and inflammatory reactions in the intestine." *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 4(6): 723-731.
- El-Kamary, S. S., M. F. Pasetti, et al. (2010). "Adjuvanted intranasal Norwalk virus-like particle vaccine elicits antibodies and antibody-secreting cells that express homing receptors for mucosal and peripheral lymphoid tissues." *J Infect Dis* 202(11): 1649-1658.
- Elinav, E., J. Henao-Mejia, et al. (2013). "Integrative inflammasome activity in the regulation of intestinal mucosal immune responses." *Mucosal Immunol* 6(1): 4-13.
- Ewald, S. E., B. L. Lee, et al. (2008). "The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor." *Nature* 456(7222): 658-662.
- Feng, T., Y. Cong, et al. (2010). "Generation of mucosal dendritic cells from bone marrow reveals a critical role of retinoic acid." *J Immunol* 185(10): 5915-5925.
- Feuillet, V., S. Medjane, et al. (2006). "Involvement of Toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(33): 12487-12492.
- Flach, T. L., G. Ng, et al. (2011). "Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvanticity." *Nat Med* 17(4): 479-487.

## Références bibliographiques

- Foged, C., J. Hansen, et al. (2012). "License to kill: Formulation requirements for optimal priming of CD8(+) CTL responses with particulate vaccine delivery systems." Eur J Pharm Sci 45(4): 482-491.
- Fox, C. B., M. Moutaftsi, et al. (2013). "TLR4 ligand formulation causes distinct effects on antigen-specific cell-mediated and humoral immune responses." Vaccine.
- Freeman, B. E., E. Hammarlund, et al. (2012). "Regulation of innate CD8+ T-cell activation mediated by cytokines." Proc Natl Acad Sci U S A 109(25): 9971-9976.
- Fritz, J. H., R. L. Ferrero, et al. (2006). "Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease." Nat Immunol 7(12): 1250-1257.
- Fritz, J. H., L. Le Bourhis, et al. (2008). "Innate immune recognition at the epithelial barrier drives adaptive immunity: APCs take the back seat." Trends Immunol 29(1): 41-49.
- Gantner, B. N., R. M. Simmons, et al. (2003). "Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2." J Exp Med 197(9): 1107-1117.
- Garçon, N., G. Leroux-Roels, W.F. Cheng (2011). "Vaccine adjuvants." Understanding Modern Vaccines: Perspectives in Vaccinology 1(1): 89-113.
- Gautier, E. L., T. Shay, et al. (2012). "Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages." Nat Immunol 13(11): 1118-1128.
- Geissmann, F., S. Jung, et al. (2003). "Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties." Immunity 19(1): 71-82.
- Geissmann, F., M. G. Manz, et al. (2010). "Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells." Science 327(5966): 656-661.
- Giannini, S. L., E. Hanon, et al. (2006). "Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only." Vaccine 24(33-34): 5937-5949.
- Gludemans, A. K., M. Plantinga, et al. (2013). "The mucosal adjuvant cholera toxin B instructs non-mucosal dendritic cells to promote IgA production via retinoic acid and TGF-beta." PLoS One 8(3): e59822.
- Gregory, A. E., R. Titball, et al. (2013). "Vaccine delivery using nanoparticles." Front Cell Infect Microbiol 3: 13.
- Gresnigt, M. S., B. Rosler, et al. (2013). "The IL-36 receptor pathway regulates *Aspergillus fumigatus*-induced Th1 and Th17 responses." Eur J Immunol 43(2): 416-426.
- Greter, M., J. Helft, et al. (2012). "GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells." Immunity 36(6): 1031-1046.
- Guilliams, M., K. Crozat, et al. (2010). "Skin-draining lymph nodes contain dermis-derived CD103(-) dendritic cells that constitutively produce retinoic acid and induce Foxp3(+) regulatory T cells." Blood 115(10): 1958-1968.
- Guilliams, M., S. Henri, et al. (2010). "From skin dendritic cells to a simplified classification of human and mouse dendritic cell subsets." Eur J Immunol 40(8): 2089-2094.
- Guilliams, M., B. N. Lambrecht, et al. (2013). "Division of labor between lung dendritic cells and macrophages in the defense against pulmonary infections." Mucosal Immunol 6(3): 464-473.
- Gustafsson, T., Y. J. Hua, et al. (2013). "Direct interaction between cholera toxin and dendritic cells is required for oral adjuvant activity." Eur J Immunol 43(7): 1779-1788.
- Guy, B. (2007). "The perfect mix: recent progress in adjuvant research." Nat Rev Microbiol 5(7): 505-517.
- Hall, J. A., J. R. Grainger, et al. (2011). "The role of retinoic acid in tolerance and immunity." Immunity 35(1): 13-22.

## Références bibliographiques

- Hamilton, J. A. (2008). "Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity." Nat Rev Immunol 8(7): 533-544.
- Hammad, H., M. Chieppa, et al. (2009). "House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells." Nat Med 15(4): 410-416.
- Hammad, H. and B. N. Lambrecht (2008). "Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma." Nat Rev Immunol 8(3): 193-204.
- Hancock, R. E., A. Nijnik, et al. (2012). "Modulating immunity as a therapy for bacterial infections." Nat Rev Microbiol 10(4): 243-254.
- Harandi, A. M., D. Medaglini, et al. (2010). "Vaccine adjuvants: a priority for vaccine research." Vaccine 28(12): 2363-2366.
- Hardison, S. E. and G. D. Brown (2012). "C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity." Nat Immunol 13(9): 817-822.
- Hashimoto, D., A. Chow, et al. (2013). "Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes." Immunity 38(4): 792-804.
- Hashimoto, D., J. Miller, et al. (2011). "Dendritic cell and macrophage heterogeneity in vivo." Immunity 35(3): 323-335.
- He, B., W. Xu, et al. (2007). "Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL." Immunity 26(6): 812-826.
- Heath, W. R. and F. R. Carbone (2009). "Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces." Nat Immunol 10(12): 1237-1244.
- Hedayat, M., M. G. Netea, et al. (2011). "Targeting of Toll-like receptors: a decade of progress in combating infectious diseases." Lancet Infect Dis 11(9): 702-712.
- Hennessy, E. J., A. E. Parker, et al. (2010). "Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics?" Nat Rev Drug Discov 9(4): 293-307.
- Hervouet, C., C. Luci, et al. (2013). "Antigen-bearing dendritic cells from the sublingual mucosa recirculate to distant systemic lymphoid organs to prime mucosal CD8 T cells." Mucosal Immunol.
- Hirota, K., J. E. Turner, et al. (2013). "Plasticity of Th17 cells in Peyer's patches is responsible for the induction of T cell-dependent IgA responses." Nat Immunol 14(4): 372-379.
- Hoeffel, G., Y. Wang, et al. (2012). "Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages." J Exp Med 209(6): 1167-1181.
- Hogenesch, H. (2012). "Mechanism of immunopotentiality and safety of aluminum adjuvants." Front Immunol 3: 406.
- Holmgren, J., J. Adamsson, et al. (2005). "Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA." Immunol Lett 97(2): 181-188.
- Holmgren, J. and A. M. Svennerholm (2012). "Vaccines against mucosal infections." Curr Opin Immunol 24(3): 343-353.
- Holt, P. G., D. H. Strickland, et al. (2008). "Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract." Nat Rev Immunol 8(2): 142-152.
- Hong, S. H., Y. H. Byun, et al. (2012). "Intranasal administration of a flagellin-adjuvanted inactivated influenza vaccine enhances mucosal immune responses to protect mice against lethal infection." Vaccine 30(2): 466-474.
- Honko, A. N. and S. B. Mizel (2004). "Mucosal administration of flagellin induces innate immunity in the mouse lung." Infect Immun 72(11): 6676-6679.

## Références bibliographiques

- Honko, A. N., N. Sriranganathan, et al. (2006). "Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*." *Infect Immun* 74(2): 1113-1120.
- Hugot, J. P., M. Chamaillard, et al. (2001). "Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease." *Nature* 411(6837): 599-603.
- Huleatt, J. W., V. Nakaar, et al. (2008). "Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin." *Vaccine* 26(2): 201-214.
- Hume, D. A., N. Mabbott, et al. (2013). "Can DCs be distinguished from macrophages by molecular signatures?" *Nat Immunol* 14(8): 876.
- Hutchison, S., R. A. Benson, et al. (2012). "Antigen depot is not required for alum adjuvanticity." *FASEB J* 26(3): 1272-1279.
- Idoyaga, J., A. Lubkin, et al. (2011). "Comparable T helper 1 (Th1) and CD8 T-cell immunity by targeting HIV gag p24 to CD8 dendritic cells within antibodies to Langerin, DEC205, and Clec9A." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(6): 2384-2389.
- Iijima, N., L. M. Mattei, et al. (2011). "Recruited inflammatory monocytes stimulate antiviral Th1 immunity in infected tissue." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(1): 284-289.
- Islam, M. A., J. Firdous, et al. (2012). "Design and application of chitosan microspheres as oral and nasal vaccine carriers: an updated review." *Int J Nanomedicine* 7: 6077-6093.
- Iwasaki, A. (2007). "Mucosal dendritic cells." *Annu Rev Immunol* 25: 381-418.
- Iwasaki, A. and B. L. Kelsall (1999). "Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells." *J Exp Med* 190(2): 229-239.
- Jaffar, Z., M. E. Ferrini, et al. (2009). "Cutting edge: lung mucosal Th17-mediated responses induce polymeric Ig receptor expression by the airway epithelium and elevate secretory IgA levels." *J Immunol* 182(8): 4507-4511.
- Janeway, C. A., Jr. (1989). "Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1: 1-13.
- Janot, L., J. C. Sirard, et al. (2009). "Radioresistant cells expressing TLR5 control the respiratory epithelium's innate immune responses to flagellin." *Eur J Immunol* 39(6): 1587-1596.
- Joffre, O., M. A. Nolte, et al. (2009). "Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity." *Immunol Rev* 227(1): 234-247.
- Kalams, S. A., S. Parker, et al. (2012). "Safety and immunogenicity of an HIV-1 gag DNA vaccine with or without IL-12 and/or IL-15 plasmid cytokine adjuvant in healthy, HIV-1 uninfected adults." *PLoS One* 7(1): e29231.
- Kalams, S. A., S. D. Parker, et al. (2013). "Safety and Comparative Immunogenicity of an HIV-1 DNA Vaccine in Combination with Plasmid Interleukin 12 and Impact of Intramuscular Electroporation for Delivery." *J Infect Dis* 208(5): 818-829.
- Kamada, N., G. Y. Chen, et al. (2013). "Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota." *Nat Immunol* 14(7): 685-690.
- Kamphuis, T., M. Shafique, et al. (2013). "Efficacy and safety of an intranasal virosomal respiratory syncytial virus vaccine adjuvanted with monophosphoryl lipid A in mice and cotton rats." *Vaccine* 31(17): 2169-2176.
- Kandasamy, M., P. C. Ying, et al. (2013). "Complement mediated signaling on pulmonary CD103(+) dendritic cells is critical for their migratory function in response to influenza infection." *PLoS Pathog* 9(1): e1003115.
- Kang, S. M., D. G. Yoo, et al. (2009). "Induction of long-term protective immune responses by influenza H5N1 virus-like particles." *PLoS One* 4(3): e4667.

## Références bibliographiques

- Kang, Y., L. Xu, et al. (2008). "Cutting edge: Immunosuppressant as adjuvant for tolerogenic immunization." *J Immunol* 180(8): 5172-5176.
- Kanneganti, T. D., M. Lamkanfi, et al. (2007). "Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease." *Immunity* 27(4): 549-559.
- Kapsenberg, M. L. (2003). "Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization." *Nat Rev Immunol* 3(12): 984-993.
- Kasturi, S. P., I. Skountzou, et al. (2011). "Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity." *Nature* 470(7335): 543-547.
- Kawai, T. and S. Akira (2007). "TLR signaling." *Semin Immunol* 19(1): 24-32.
- Kawai, T. and S. Akira (2010). "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors." *Nat Immunol* 11(5): 373-384.
- Kayamuro, H., Y. Yoshioka, et al. (2010). "Interleukin-1 family cytokines as mucosal vaccine adjuvants for induction of protective immunity against influenza virus." *J Virol* 84(24): 12703-12712.
- Keijzer, C., B. Slutter, et al. (2011). "PLGA, PLGA-TMC and TMC-TPP nanoparticles differentially modulate the outcome of nasal vaccination by inducing tolerance or enhancing humoral immunity." *PLoS One* 6(11): e26684.
- Kersse, K., M. J. Bertrand, et al. (2011). "NOD-like receptors and the innate immune system: coping with danger, damage and death." *Cytokine Growth Factor Rev* 22(5-6): 257-276.
- Kim, D. Y., A. Sato, et al. (2011). "The airway antigen sampling system: respiratory M cells as an alternative gateway for inhaled antigens." *J Immunol* 186(7): 4253-4262.
- Kinnebrew, M. A., C. G. Buffie, et al. (2012). "Interleukin 23 production by intestinal CD103(+)CD11b(+) dendritic cells in response to bacterial flagellin enhances mucosal innate immune defense." *Immunity* 36(2): 276-287.
- Klebanoff, C. A., S. P. Spencer, et al. (2013). "Retinoic acid controls the homeostasis of pre-cDC-derived splenic and intestinal dendritic cells." *J Exp Med*.
- Klein, S. G., J. Hennen, et al. (2011). "Potential of coculture in vitro models to study inflammatory and sensitizing effects of particles on the lung." *Toxicol In Vitro* 25(8): 1516-1534.
- Kool, M., H. Hammad, et al. (2012). "Cellular networks controlling Th2 polarization in allergy and immunity." *F1000 Biol Rep* 4: 6.
- Kool, M., T. Soullie, et al. (2008). "Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells." *J Exp Med* 205(4): 869-882.
- Korn, T., E. Bettelli, et al. (2009). "IL-17 and Th17 Cells." *Annu Rev Immunol* 27: 485-517.
- Kumar, H., T. Kawai, et al. (2009). "Toll-like receptors and innate immunity." *Biochem Biophys Res Commun* 388(4): 621-625.
- Kupz, A., G. Guarda, et al. (2012). "NLRC4 inflammasomes in dendritic cells regulate noncognate effector function by memory CD8(+) T cells." *Nat Immunol* 13(2): 162-169.
- Lambrecht, B. N. and H. Hammad (2012). "The airway epithelium in asthma." *Nat Med* 18(5): 684-692.
- Lambrecht, B. N. and H. Hammad (2012). "Lung dendritic cells in respiratory viral infection and asthma: from protection to immunopathology." *Annu Rev Immunol* 30: 243-270.
- Lambrecht, B. N., R. A. Pauwels, et al. (2000). "Induction of rapid T cell activation, division, and recirculation by intratracheal injection of dendritic cells in a TCR transgenic model." *J Immunol* 164(6): 2937-2946.
- Langlet, C., S. Tamoutounour, et al. (2012). "CD64 expression distinguishes monocyte-derived and conventional dendritic cells and reveals their distinct role during intramuscular immunization." *J Immunol* 188(4): 1751-1760.



## Références bibliographiques

- Latz, E., T. S. Xiao, et al. (2013). "Activation and regulation of the inflammasomes." Nat Rev Immunol 13(6): 397-411.
- Le Borgne, M., N. Etchart, et al. (2006). "Dendritic cells rapidly recruited into epithelial tissues via CCR6/CCL20 are responsible for CD8+ T cell crosspriming in vivo." Immunity 24(2): 191-201.
- Lee, Y. K., R. Mukasa, et al. (2009). "Developmental plasticity of Th17 and Treg cells." Curr Opin Immunol 21(3): 274-280.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, et al. (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults." Cell 86(6): 973-983.
- Leroux-Roels, G. (2010). "Unmet needs in modern vaccinology: adjuvants to improve the immune response." Vaccine 28 Suppl 3: C25-36.
- Letran, S. E., S. J. Lee, et al. (2011). "TLR5 functions as an endocytic receptor to enhance flagellin-specific adaptive immunity." Eur J Immunol 41(1): 29-38.
- Lewis, D. J., Z. Huo, et al. (2009). "Transient facial nerve paralysis (Bell's palsy) following intranasal delivery of a genetically detoxified mutant of *Escherichia coli* heat labile toxin." PLoS One 4(9): e6999.
- Li, Y., I. C. Berke, et al. (2012). "DNA binding to proteolytically activated TLR9 is sequence-independent and enhanced by DNA curvature." EMBO J 31(4): 919-931.
- Lindqvist, M., I. Nookaew, et al. (2011). "Unraveling molecular signatures of immunostimulatory adjuvants in the female genital tract through systems biology." PLoS One 6(6): e20448.
- Liu, Y. J., V. Soumelis, et al. (2007). "TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation." Annu Rev Immunol 25: 193-219.
- Loo, Y. M. and M. Gale, Jr. (2011). "Immune signaling by RIG-I-like receptors." Immunity 34(5): 680-692.
- Lu, J. and P. D. Sun (2012). "The structure of the TLR5-flagellin complex: a new mode of pathogen detection, conserved receptor dimerization for signaling." Sci Signal 5(223): pe11.
- Lycke, N. (2012). "Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations." Nat Rev Immunol 12(8): 592-605.
- Lycke, N. and M. Bemark (2010). "Mucosal adjuvants and long-term memory development with special focus on CTA1-DD and other ADP-ribosylating toxins." Mucosal Immunol 3(6): 556-566.
- Macdonald, D. C., H. Singh, et al. (2013). "Harnessing alveolar macrophages for sustained mucosal T-cell recall confers long-term protection to mice against lethal influenza challenge without clinical disease." Mucosal Immunol.
- MacLean, J. A., W. Xia, et al. (1996). "Sequestration of inhaled particulate antigens by lung phagocytes. A mechanism for the effective inhibition of pulmonary cell-mediated immunity." Am J Pathol 148(2): 657-666.
- Macpherson, A. J., K. D. McCoy, et al. (2008). "The immune geography of IgA induction and function." Mucosal Immunol 1(1): 11-22.
- Magalhaes, J. G., I. Tattoli, et al. (2007). "The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens." Semin Immunol 19(2): 106-115.
- Magnusson, S. E., J. M. Reimer, et al. (2013). "Immune enhancing properties of the novel Matrix-M adjuvant leads to potentiated immune responses to an influenza vaccine in mice." Vaccine 31(13): 1725-1733.

## Références bibliographiques

- Makidon, P. E., I. M. Belyakov, et al. (2012). "Nanoemulsion mucosal adjuvant uniquely activates cytokine production by nasal ciliated epithelium and induces dendritic cell trafficking." *Eur J Immunol* 42(8): 2073-2086.
- Mansson Kvarnhammar, A., L. Tengroth, et al. (2013). "Innate Immune Receptors in Human Airway Smooth Muscle Cells: Activation by TLR1/2, TLR3, TLR4, TLR7 and NOD1 Agonists." *PLoS One* 8(7): e68701.
- Marichal, T., K. Ohata, et al. (2011). "DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity." *Nat Med* 17(8): 996-1002.
- Martin, T. R. and C. W. Frevert (2005). "Innate immunity in the lungs." *Proc Am Thorac Soc* 2(5): 403-411.
- Martin-Fontecha, A., L. L. Thomsen, et al. (2004). "Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming." *Nat Immunol* 5(12): 1260-1265.
- Mathur, R., H. Oh, et al. (2012). "A mouse model of Salmonella typhi infection." *Cell* 151(3): 590-602.
- Matzinger, P. (2002). "The danger model: a renewed sense of self." *Science* 296(5566): 301-305.
- Mbow, M. L., E. De Gregorio, et al. (2011). "Alum's adjuvant action: grease is the word." *Nat Med* 17(4): 415-416.
- McKee, A. S., M. A. Burchill, et al. (2013). "Host DNA released in response to aluminum adjuvant enhances MHC class II-mediated antigen presentation and prolongs CD4 T-cell interactions with dendritic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(12): E1122-1131.
- Means, T. K., F. Hayashi, et al. (2003). "The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells." *J Immunol* 170(10): 5165-5175.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, et al. (1997). "A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity." *Nature* 388(6640): 394-397.
- Merad, M., P. Sathe, et al. (2013). "The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting." *Annu Rev Immunol* 31: 563-604.
- Meredith, M. M., K. Liu, et al. (2012). "Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btbd4) defines the classical dendritic cell lineage." *J Exp Med* 209(6): 1153-1165.
- Miao, E. A., C. M. Alpuche-Aranda, et al. (2006). "Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf." *Nat Immunol* 7(6): 569-575.
- Miao, E. A., D. P. Mao, et al. (2010). "Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(7): 3076-3080.
- Mikhak, Z., J. P. Strassner, et al. (2013). "Lung dendritic cells imprint T cell lung homing and promote lung immunity through the chemokine receptor CCR4." *J Exp Med* 210(9): 1855-1869.
- Miller, J. C., B. D. Brown, et al. (2012). "Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage." *Nat Immunol* 13(9): 888-899.
- Miller, L. S. and R. L. Modlin (2007). "Toll-like receptors in the skin." *Semin Immunopathol* 29(1): 15-26.
- Mizel, S. B., A. H. Graff, et al. (2009). "Flagellin-F1-V fusion protein is an effective plague vaccine in mice and two species of nonhuman primates." *Clin Vaccine Immunol* 16(1): 21-28.
- Moon, J. J., H. Suh, et al. (2012). "Enhancing humoral responses to a malaria antigen with nanoparticle vaccines that expand Tfh cells and promote germinal center induction." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(4): 1080-1085.

## Références bibliographiques

- Moon, M. R., A. A. Parikh, et al. (1999). "Complement component C3 production in IL-1beta-stimulated human intestinal epithelial cells is blocked by NF-kappaB inhibitors and by transfection with ser 32/36 mutant IkappaBalpha." *J Surg Res* 82(1): 48-55.
- Morel, S., A. Didierlaurent, et al. (2011). "Adjuvant System AS03 containing alpha-tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity." *Vaccine* 29(13): 2461-2473.
- Mosca, F., E. Tritto, et al. (2008). "Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(30): 10501-10506.
- Mosmann, T. R., H. Cherwinski, et al. (1986). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." *J Immunol* 136(7): 2348-2357.
- Mosser, D. M. and J. P. Edwards (2008). "Exploring the full spectrum of macrophage activation." *Nat Rev Immunol* 8(12): 958-969.
- Munoz, N., L. Van Maele, et al. (2010). "Mucosal administration of flagellin protects mice from *Streptococcus pneumoniae* lung infection." *Infect Immun* 78(10): 4226-4233.
- Murphy, J., R. Summer, et al. (2008). "The prolonged life-span of alveolar macrophages." *Am J Respir Cell Mol Biol* 38(4): 380-385.
- Nakano, H., M. E. Free, et al. (2012). "Pulmonary CD103(+) dendritic cells prime Th2 responses to inhaled allergens." *Mucosal Immunol* 5(1): 53-65.
- Nakano, H., K. L. Lin, et al. (2009). "Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses." *Nat Immunol* 10(4): 394-402.
- Napolitani, G., A. Rinaldi, et al. (2005). "Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells." *Nat Immunol* 6(8): 769-776.
- Nathan, C. (2006). "Neutrophils and immunity: challenges and opportunities." *Nat Rev Immunol* 6(3): 173-182.
- Nempont, C., D. Cayet, et al. (2008). "Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity." *J Immunol* 181(3): 2036-2043.
- Nenci, A., C. Becker, et al. (2007). "Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation." *Nature* 446(7135): 557-561.
- Netea, M. G., G. Ferwerda, et al. (2005). "Nucleotide-binding oligomerization domain-2 modulates specific TLR pathways for the induction of cytokine release." *J Immunol* 174(10): 6518-6523.
- Nguyen, C. T., S. Y. Kim, et al. (2011). "Intranasal immunization with recombinant PspA fused with a flagellin enhances cross-protective immunity against *Streptococcus pneumoniae* infection in mice." *Vaccine* 29(34): 5731-5739.
- Nolte, M. A., S. Leibundgut-Landmann, et al. (2007). "Dendritic cell quiescence during systemic inflammation driven by LPS stimulation of radioresistant cells in vivo." *J Exp Med* 204(6): 1487-1501.
- O'Hagan, D. T., G. S. Ott, et al. (2012). "The mechanism of action of MF59 - an innately attractive adjuvant formulation." *Vaccine* 30(29): 4341-4348.
- O'Neill, L. A., C. E. Bryant, et al. (2009). "Therapeutic targeting of Toll-like receptors for infectious and inflammatory diseases and cancer." *Pharmacol Rev* 61(2): 177-197.
- O'Neill, L. A., D. Golenbock, et al. (2013). "The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity." *Nat Rev Immunol* 13(6): 453-460.
- O'Shea, J. J. and W. E. Paul (2010). "Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells." *Science* 327(5969): 1098-1102.

## Références bibliographiques

- Orr, M. T., C. B. Fox, et al. (2013). "Adjuvant formulation structure and composition are critical for the development of an effective vaccine against tuberculosis." J Control Release 172(1): 190-200.
- Oyewumi, M. O., A. Kumar, et al. (2010). "Nano-microparticles as immune adjuvants: correlating particle sizes and the resultant immune responses." Expert Rev Vaccines 9(9): 1095-1107.
- Palm, N. W. and R. Medzhitov (2009). "Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity." Immunol Rev 227(1): 221-233.
- Pang, I. K., T. Ichinohe, et al. (2013). "IL-1R signaling in dendritic cells replaces pattern-recognition receptors in promoting CD8(+) T cell responses to influenza A virus." Nat Immunol 14(3): 246-253.
- Persson, E. K., C. L. Scott, et al. (2013). "Dendritic cell subsets in the intestinal lamina propria: Ontogeny and function." Eur J Immunol.
- Persson, E. K., H. Uronen-Hansson, et al. (2013). "IRF4 transcription-factor-dependent CD103(+)CD11b(+) dendritic cells drive mucosal T helper 17 cell differentiation." Immunity 38(5): 958-969.
- Pesce, I., E. Monaci, et al. (2010). "Intranasal administration of CpG induces a rapid and transient cytokine response followed by dendritic and natural killer cell activation and recruitment in the mouse lung." J Innate Immun 2(2): 144-159.
- Peters, W., M. Dupuis, et al. (2000). "A mechanism for the impaired IFN-gamma production in C-C chemokine receptor 2 (CCR2) knockout mice: role of CCR2 in linking the innate and adaptive immune responses." J Immunol 165(12): 7072-7077.
- Pichavant, M., S. Taront, et al. (2006). "Impact of bronchial epithelium on dendritic cell migration and function: modulation by the bacterial motif KpOmpA." J Immunol 177(9): 5912-5919.
- Pino, O., M. Martin, et al. (2005). "Cellular mechanisms of the adjuvant activity of the flagellin component FljB of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium to potentiate mucosal and systemic responses." Infect Immun 73(10): 6763-6770.
- Plantinga, M., M. Guilliams, et al. (2013). "Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen." Immunity 38(2): 322-335.
- Plantinga, M., H. Hammad, et al. (2010). "Origin and functional specializations of DC subsets in the lung." Eur J Immunol 40(8): 2112-2118.
- Plotkin, S. A. (2005). "Vaccines: past, present and future." Nat Med 11(4 Suppl): S5-11.
- Poulin, L. F., Y. Reyat, et al. (2012). "DNGR-1 is a specific and universal marker of mouse and human Batf3-dependent dendritic cells in lymphoid and nonlymphoid tissues." Blood 119(25): 6052-6062.
- Pulendran, B. (2005). "Variation of the immune response with dendritic cells and pathogen recognition receptors." J Immunol 174(5): 2457-2465.
- Radtke, F., H. R. MacDonald, et al. (2013). "Regulation of innate and adaptive immunity by Notch." Nat Rev Immunol 13(6): 427-437.
- Ramirez, K., R. Wahid, et al. (2012). "Intranasal vaccination with an adjuvanted Norwalk virus-like particle vaccine elicits antigen-specific B memory responses in human adult volunteers." Clin Immunol 144(2): 98-108.
- Ramiscal, R. R. and C. G. Vinuesa (2013). "T-cell subsets in the germinal center." Immunol Rev 252(1): 146-155.
- Ramos, H. C., M. Rumbo, et al. (2004). "Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa." Trends Microbiol 12(11): 509-517.
- Ramos, H. J., M. C. Lanteri, et al. (2012). "IL-1beta signaling promotes CNS-intrinsic immune control of West Nile virus infection." PLoS Pathog 8(11): e1003039.

## Références bibliographiques

- Randall, T. D. (2010). "Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) structure and function." Adv Immunol 107: 187-241.
- Randolph, G. J., G. Sanchez-Schmitz, et al. (2005). "Factors and signals that govern the migration of dendritic cells via lymphatics: recent advances." Springer Semin Immunopathol 26(3): 273-287.
- Rappuoli, R., C. W. Mandl, et al. (2011). "Vaccines for the twenty-first century society." Nat Rev Immunol 11(12): 865-872.
- Re, F. and J. L. Strominger (2004). "IL-10 released by concomitant TLR2 stimulation blocks the induction of a subset of Th1 cytokines that are specifically induced by TLR4 or TLR3 in human dendritic cells." J Immunol 173(12): 7548-7555.
- Reimer, J. M., K. H. Karlsson, et al. (2012). "Matrix-M adjuvant induces local recruitment, activation and maturation of central immune cells in absence of antigen." PLoS One 7(7): e41451.
- Reis e Sousa, C. (2006). "Dendritic cells in a mature age." Nat Rev Immunol 6(6): 476-483.
- Roach, J. C., G. Glusman, et al. (2005). "The evolution of vertebrate Toll-like receptors." Proc Natl Acad Sci U S A 102(27): 9577-9582.
- Ruane, D., L. Brane, et al. (2013). "Lung dendritic cells induce migration of protective T cells to the gastrointestinal tract." J Exp Med 210(9): 1871-1888.
- Rudd, B. D., G. D. Luker, et al. (2007). "Type I interferon regulates respiratory virus infected dendritic cell maturation and cytokine production." Viral Immunol 20(4): 531-540.
- Sabbah, A., T. H. Chang, et al. (2009). "Activation of innate immune antiviral responses by Nod2." Nat Immunol 10(10): 1073-1080.
- Saenz, S. A., B. C. Taylor, et al. (2008). "Welcome to the neighborhood: epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites." Immunol Rev 226: 172-190.
- Safinia, N., J. Leech, et al. (2013). "Promoting transplantation tolerance; adoptive regulatory T cell therapy." Clin Exp Immunol 172(2): 158-168.
- Saitoh, S. (2009). "Chaperones and transport proteins regulate TLR4 trafficking and activation." Immunobiology 214(7): 594-600.
- Salazar-Gonzalez, R. M. and S. J. McSorley (2005). "Salmonella flagellin, a microbial target of the innate and adaptive immune system." Immunol Lett.
- Salazar-Gonzalez, R. M., A. Srinivasan, et al. (2007). "Salmonella flagellin induces bystander activation of splenic dendritic cells and hinders bacterial replication in vivo." J Immunol 179(9): 6169-6175.
- Salzman, N. H., D. Ghosh, et al. (2003). "Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin." Nature 422(6931): 522-526.
- Samatey, F. A., K. Imada, et al. (2001). "Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling." Nature 410(6826): 331-337.
- Sanders, C. J., D. A. Moore, 3rd, et al. (2008). "Both radioresistant and hemopoietic cells promote innate and adaptive immune responses to flagellin." J Immunol 180(11): 7184-7192.
- Sansonetti, P. J. (2004). "War and peace at mucosal surfaces." Nat Rev Immunol 4(12): 953-964.
- Satpathy, A. T., W. Kc, et al. (2012). "Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages." J Exp Med 209(6): 1135-1152.
- Schaerli, P., K. Willmann, et al. (2000). "CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function." J Exp Med 192(11): 1553-1562.

## Références bibliographiques

- Schlitzer, A., N. McGovern, et al. (2013). "IRF4 transcription factor-dependent CD11b+ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses." Immunity 38(5): 970-983.
- Schmudde, I., H. A. Strover, et al. (2013). "C5a receptor signalling in dendritic cells controls the development of maladaptive Th2 and Th17 immunity in experimental allergic asthma." Mucosal Immunol 6(4): 807-825.
- Schroder, K. and J. Tschopp (2010). "The inflammasomes." Cell 140(6): 821-832.
- Segura, E. and S. Amigorena (2013). "Inflammatory dendritic cells in mice and humans." Trends Immunol 34(9): 440-445.
- Serbina, N. V., T. Jia, et al. (2008). "Monocyte-mediated defense against microbial pathogens." Annu Rev Immunol 26: 421-452.
- Serbina, N. V. and E. G. Pamer (2006). "Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2." Nat Immunol 7(3): 311-317.
- Serbina, N. V., T. P. Salazar-Mather, et al. (2003). "TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection." Immunity 19(1): 59-70.
- Seubert, A., S. Calabro, et al. (2011). "Adjuvanticity of the oil-in-water emulsion MF59 is independent of Nlrp3 inflammasome but requires the adaptor protein MyD88." Proc Natl Acad Sci U S A 108(27): 11169-11174.
- Seubert, A., E. Monaci, et al. (2008). "The adjuvants aluminum hydroxide and MF59 induce monocyte and granulocyte chemoattractants and enhance monocyte differentiation toward dendritic cells." J Immunol 180(8): 5402-5412.
- Shi, C. and E. G. Pamer (2011). "Monocyte recruitment during infection and inflammation." Nat Rev Immunol 11(11): 762-774.
- Shlomchik, M. J. and F. Weisel (2012). "Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells." Immunol Rev 247(1): 52-63.
- Sigmundsdottir, H., J. Pan, et al. (2007). "DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to 'program' T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27." Nat Immunol 8(3): 285-293.
- Sirard, J. C., A. Didierlaurent, et al. (2009). "Toll-like receptor 5- and lymphotoxin beta receptor-dependent epithelial Ccl20 expression involves the same NF-kappaB binding site but distinct NF-kappaB pathways and dynamics." Biochim Biophys Acta 1789(5): 386-394.
- Smith, K. D., E. Andersen-Nissen, et al. (2003). "Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility." Nat Immunol 4(12): 1247-1253.
- Soroosh, P., T. A. Doherty, et al. (2013). "Lung-resident tissue macrophages generate Foxp3+ regulatory T cells and promote airway tolerance." J Exp Med 210(4): 775-788.
- Sporri, R. and C. Reis e Sousa (2005). "Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function." Nat Immunol 6(2): 163-170.
- Spreafico, R., P. Ricciardi-Castagnoli, et al. (2010). "The controversial relationship between NLRP3, alum, danger signals and the next-generation adjuvants." Eur J Immunol 40(3): 638-642.
- Stern, A. M. and H. Markel (2005). "The history of vaccines and immunization: familiar patterns, new challenges." Health Aff (Millwood) 24(3): 611-621.
- Stout, R. D., C. Jiang, et al. (2005). "Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences." J Immunol 175(1): 342-349.

## Références bibliographiques

- Suzuki, Y., T. Suda, et al. (2012). "Mouse CD11b<sup>high</sup> lung dendritic cells have more potent capability to induce IgA than CD103<sup>+</sup> lung dendritic cells in vitro." Am J Respir Cell Mol Biol 46(6): 773-780.
- Swamy, M., C. Jamora, et al. (2010). "Epithelial decision makers: in search of the 'epimmunome'." Nat Immunol 11(8): 656-665.
- Takeuchi, O. and S. Akira (2010). "Pattern recognition receptors and inflammation." Cell 140(6): 805-820.
- Tamoutounour, S., S. Henri, et al. (2012). "CD64 distinguishes macrophages from dendritic cells in the gut and reveals the Th1-inducing role of mesenteric lymph node macrophages during colitis." Eur J Immunol 42(12): 3150-3166.
- Tan, A. M., H. C. Chen, et al. (2010). "TLR4 signaling in stromal cells is critical for the initiation of allergic Th2 responses to inhaled antigen." J Immunol 184(7): 3535-3544.
- Tanji, H., U. Ohto, et al. (2013). "Structural reorganization of the Toll-like receptor 8 dimer induced by agonistic ligands." Science 339(6126): 1426-1429.
- Tezuka, H., Y. Abe, et al. (2007). "Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells." Nature 448(7156): 929-933.
- Thompson, A. L., B. T. Johnson, et al. (2012). "Maximal adjuvant activity of nasally delivered IL-1 $\alpha$  requires adjuvant-responsive CD11c<sup>(+)</sup> cells and does not correlate with adjuvant-induced in vivo cytokine production." J Immunol 188(6): 2834-2846.
- Tritto, E., F. Mosca, et al. (2009). "Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants." Vaccine 27(25-26): 3331-3334.
- Trunk, G. and A. Oxenius (2012). "Innate instruction of CD4<sup>+</sup> T cell immunity in respiratory bacterial infection." J Immunol 189(2): 616-628.
- Uematsu, S., K. Fujimoto, et al. (2008). "Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5." Nat Immunol 9(7): 769-776.
- Uematsu, S., M. H. Jang, et al. (2006). "Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c<sup>+</sup> lamina propria cells." Nat Immunol 7(8): 868-874.
- Underhill, D. M. (2007). "Collaboration between the innate immune receptors dectin-1, TLRs, and Nods." Immunol Rev 219: 75-87.
- Unkel, B., K. Hoegner, et al. (2012). "Alveolar epithelial cells orchestrate DC function in murine viral pneumonia." J Clin Invest 122(10): 3652-3664.
- Unnikrishnan, M., R. Rappuoli, et al. (2012). "Recombinant bacterial vaccines." Curr Opin Immunol 24(3): 337-342.
- Vaishnava, S., M. Yamamoto, et al. (2011). "The antibacterial lectin RegIII $\gamma$  promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine." Science 334(6053): 255-258.
- van de Laar, L., P. J. Coffey, et al. (2012). "Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy." Blood 119(15): 3383-3393.
- van Gisbergen, K. P., M. Sanchez-Hernandez, et al. (2005). "Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN." J Exp Med 201(8): 1281-1292.
- van Heel, D. A., S. Ghosh, et al. (2005). "Synergy between TLR9 and NOD2 innate immune responses is lost in genetic Crohn's disease." Gut 54(11): 1553-1557.
- Van Maele, L., C. Carnoy, et al. (2010). "TLR5 signaling stimulates the innate production of IL-17 and IL-22 by CD3<sup>(neg)</sup>CD127<sup>+</sup> immune cells in spleen and mucosa." J Immunol 185(2): 1177-1185.

## Références bibliographiques

- Vareille, M., E. Kieninger, et al. (2011). "The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses." *Clin Microbiol Rev* 24(1): 210-229.
- Vigne, S., G. Palmer, et al. (2011). "IL-36R ligands are potent regulators of dendritic and T cells." *Blood* 118(22): 5813-5823.
- Vigne, S., G. Palmer, et al. (2012). "IL-36 signaling amplifies Th1 responses by enhancing proliferation and Th1 polarization of naive CD4+ T cells." *Blood* 120(17): 3478-3487.
- Villadangos, J. A. and P. Schnorrer (2007). "Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo." *Nat Rev Immunol* 7(7): 543-555.
- Villadangos, J. A. and L. Young (2008). "Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells." *Immunity* 29(3): 352-361.
- Wan, C. K., J. Oh, et al. (2013). "The cytokines IL-21 and GM-CSF have opposing regulatory roles in the apoptosis of conventional dendritic cells." *Immunity* 38(3): 514-527.
- Wang, C., S. G. Kang, et al. (2009). "The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut." *Mucosal Immunol* 2(2): 173-183.
- Wang, J., Y. Hu, et al. (2009). "Negative regulation of Toll-like receptor signaling pathway." *Microbes Infect* 11(3): 321-327.
- Weaver, C. T., L. E. Harrington, et al. (2006). "Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties." *Immunity* 24(6): 677-688.
- Willart, M. A., K. Deswarte, et al. (2012). "Interleukin-1alpha controls allergic sensitization to inhaled house dust mite via the epithelial release of GM-CSF and IL-33." *J Exp Med* 209(8): 1505-1517.
- Wilson, N. S. and J. A. Villadangos (2005). "Regulation of antigen presentation and cross-presentation in the dendritic cell network: facts, hypothesis, and immunological implications." *Adv Immunol* 86: 241-305.
- Winstone, N., A. J. Wilson, et al. (2011). "Enhanced control of pathogenic Simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication in macaques immunized with an interleukin-12 plasmid and a DNA prime-viral vector boost vaccine regimen." *J Virol* 85(18): 9578-9587.
- Woodrow, K. A., K. M. Bennett, et al. (2012). "Mucosal vaccine design and delivery." *Annu Rev Biomed Eng* 14: 17-46.
- Xie, Y., T. Takai, et al. (2012). "Long TSLP transcript expression and release of TSLP induced by TLR ligands and cytokines in human keratinocytes." *J Dermatol Sci* 66(3): 233-237.
- Yewdell, J. W. and S. M. Haeryfar (2005). "Understanding presentation of viral antigens to CD8+ T cells in vivo: the key to rational vaccine design." *Annu Rev Immunol* 23: 651-682.
- Yonekura, K., S. Maki-Yonekura, et al. (2003). "Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy." *Nature* 424(6949): 643-650.
- Yu, F. S., M. D. Cornicelli, et al. (2010). "Flagellin stimulates protective lung mucosal immunity: role of cathelicidin-related antimicrobial peptide." *J Immunol* 185(2): 1142-1149.
- Zelenay, S., A. M. Keller, et al. (2012). "The dendritic cell receptor DNGR-1 controls endocytic handling of necrotic cell antigens to favor cross-priming of CTLs in virus-infected mice." *J Clin Invest* 122(5): 1615-1627.
- Zheng, G., S. Zhong, et al. (2013). "Dexamethasone promotes tolerance in vivo by enriching CD11clo CD40lo tolerogenic macrophages." *Eur J Immunol* 43(1): 219-227.
- Ziegler, S. F. and D. Artis (2010). "Sensing the outside world: TSLP regulates barrier immunity." *Nat Immunol* 11(4): 289-293.
- Zygmunt, B. M., F. Rharbaoui, et al. (2009). "Intranasal immunization promotes th17 immune responses." *J Immunol* 183(11): 6933-6938.



## **Caractérisation moléculaire et cellulaire de l'activité adjuvante de la flagelline dans la vaccination muqueuse**

La vaccination est un moyen de prévention très efficace contre les infections. La majorité des vaccins sont administrés par voie sous-cutanée ou intra-musculaire avec des adjuvants et stimulent ainsi des réponses immunitaires adaptatives systémiques. Les muqueuses représentent une porte d'entrée majeure pour de nombreux pathogènes ayant un impact en Santé Publique. Cependant, peu de vaccins sont délivrés par les muqueuses en raison du manque d'adjuvants adaptés à ces voies. Ainsi le développement d'adjuvants muqueux permettrait la stimulation de réponses immunitaires locales et une protection efficace avant la dissémination des pathogènes.

Les agonistes des Toll-Like-Receptors (TLR) sont développés comme adjuvants vaccinaux car ils stimulent l'immunité innée et adaptative. Au laboratoire, la flagelline de *Salmonella enterica* qui est un puissant agoniste de TLR5 est utilisée comme modèle afin de disséquer les mécanismes d'action des adjuvants muqueux. En effet, l'administration intranasale de vaccins adjuvés par la flagelline se caractérise par une réponse T CD4<sup>+</sup> de type Th1/Th2, une réponse en anticorps sécrétoires dans le compartiment respiratoire et une réponse systémique contre les antigènes vaccinaux. Seule l'activation de TLR5 dans le compartiment épithélial est nécessaire à l'activité adjuvante.

Dans un premier temps, l'analyse transcriptionnelle du tissu pulmonaire a permis d'identifier une signature épithéliale spécifique du recrutement de cellules immunitaires, en particulier de monocytes et de neutrophiles ainsi que de l'activation fonctionnelle des cellules dendritiques. L'analyse de la dynamique cellulaire au niveau du tractus respiratoire et des ganglions drainants a ensuite été réalisée en réponse à l'administration intranasale de vaccin adjuvé. Bien que les monocytes inflammatoires et les neutrophiles infiltrent massivement les poumons et capturent les antigènes, ils ne jouent pas de rôle majeur dans l'activation de la réponse immunitaire. Au contraire les cellules dendritiques conventionnelles CD11b<sup>+</sup> capturent, migrent et présentent efficacement l'antigène aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. A l'instar de l'effet adjuvant, l'activation de ces cellules dendritiques par la flagelline n'est pas directe mais requiert une expression de TLR5 dans les cellules structurales incluant les cellules épithéliales de la muqueuse. De plus, nos travaux suggèrent que les interleukines de la famille IL-1 ne sont pas à l'origine de la transactivation des cellules dendritiques.

En conclusion, ce travail de thèse ouvre des perspectives intéressantes quant au développement d'adjuvants muqueux.