

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Rôle du récepteur de chimiokine CCR3 dans l'infection du virus respiratoire syncytial

présentée par :
Vincent Wellemans

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Ali Ahmad, président-rapporteur
Dre. Sophie Laberge, directrice de recherche
Dr. Nikolaus Heveker, co-directeur
Dr. Muhammad Zafarullah , membre du jury
Dr. Bruce Mazer, examinateur externe
Dre. Céline Bergeron, représentante du doyen de la FES



GI

W
4
U58
2007
v.062



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

RÉSUMÉ

Le virus respiratoire syncytial (VRS) est une cause majeure des infections du tractus respiratoire chez les enfants et induit l'exacerbation de l'asthme à tout âge. Actuellement il n'y a pas de vaccin efficace et le développement d'une vaccination exige une meilleure compréhension de l'immunobiologie du VRS. La glycoprotéine G (gp90) d'attachement du VRS est associée à une expression excessive de chimiokines, de cytokines ainsi qu'une éosinophilie pulmonaire et une accumulation des lymphocytes T de type Th2. Notre objectif est d'étudier le rôle de la gp90 dans la réponse immunitaire et l'aggravation de l'inflammation constatée chez les patients atteints de bronchiolite. Notre hypothèse est que la gp90 agit comme un leurre de chimiokine et qu'elle initie l'infection en interagissant avec un récepteur de chimiokines.

Tout d'abord, selon nos expériences, la gp90 du VRS reconnaît le récepteur de chimiokine CCR3. En effet, la gp90 inhibe la fixation de l'éotaxine sur le CCR3 et forme un complexe protéique avec ce même récepteur. En plus, la gp90 induit la migration des éosinophiles et des cellules Th2 *in vitro* qui est inhibée par un anticorps anti-CCR3. La gp90 interviendrait dans sa pathogenèse en recrutant les lymphocytes T de type Th2 et les éosinophiles au site d'infection *via* CCR3.

Suite à la caractérisation du récepteur, différentes stratégies sont possibles pour prévenir l'infection du VRS. 1) La pénétration cellulaire du VRS peut être inhibée en bloquant le récepteur par son ligand naturel (éotaxine) ou par un anticorps anti-CCR3. Nous avons observé qu'une inhibition de l'infection des cellules épithéliales a été obtenue avec un anticorps anti-CCR3 ou de l'éotaxine recombinante. 2) Une autre technique pour empêcher l'attachement de la gp90 du VRS a été obtenue en clivant le récepteur de chimiokine CCR3 par des métalloprotéinases (MMP). Les MMPs qui constituent une famille de plus de 25 endopeptidases sont capables de couper les récepteurs des chimiokines et particulièrement le récepteur CCR3. Des expériences de immunobuvardage et de cytofluorométrie en flux montrent respectivement le clivage de CCR3 par la MMP7 et la prévention de la liaison subséquente de l'éotaxine à son récepteur. Cette forme tronquée engendre aussi une diminution de la migration des cellules en réponse à l'éotaxine. Finalement, la forme tronquée de CCR3 résulte en une

inhibition de l'infection. 3) Pour finir, nous sommes parvenus à diminuer l'infection du VRS en modulant l'expression du récepteur de chimiokine CCR3 par des glucocorticoïdes. Les cellules respiratoires épithéliales prétraitées par le *propionate de fluticasone* (FP) à une concentration de 10^{-7} M diminue la formation de plaques infectieuses virales chez des cellules épithéliales. Parallèlement, une inhibition significative de l'expression du récepteur de chimiokine CCR3 est observée lorsque les cellules sont traitées avec le FP à une concentration identique.

L'exploration et l'identification des stratégies moléculaires du VRS impliquées dans la subversion du système immunitaire, nous permettent d'élaborer de nouvelles stratégies pour des traitements possibles contre la bronchiolite et l'asthme. Le fait que le récepteur de chimiokine CCR3 puisse être bloqué par le ligand originel, clivé par des MMPs ou modulé par des glucocorticoïdes ouvre une nouvelle voie prometteuse dans l'étude de la régulation de l'infection et de l'inflammation.

Mots-clés : Virus respiratoire syncytial, Glycoprotéine G, Chimiokine, Récepteur de chimiokine, Métalloprotéase, Corticostéroïde.

ABSTRACT

Respiratory syncytial virus (RSV) is an important cause of lower respiratory tract illness in infants and has been associated with the development of asthma. Currently no safe and efficacious RSV vaccine is available. Understanding of the biological mechanisms behind an RSV infection can have important implications for strategies aimed at preventing lower respiratory tract infection. Besides its role in the initiation of a new infection cycle, the surface envelope glycoprotein G (gp90) appears to be linked to the pathogenesis of RSV disease. It has been linked to excessive production of chemokine, cytokines, airways eosinophilia and accumulation of Th2 cells in the lungs. It is not clearly understood how RSV-G protein induces these diverse effects. The objective of this proposal is to improve our understanding of gp90 in bronchiolitis. The general hypothesis is that gp90 mimics chemokine activity and that the initiation of RSV infection is mediated by the interaction between gp90 and chemokine receptors.

First, we investigated the contribution of CCR3, a chemokine receptor constitutively expressed on epithelial cells, eosinophils and Th2-type cells, in RSV infection. Indeed, gp90 forms a physical association with CCR3 and prevents the chemokine eotaxin from binding to it. In addition, an anti-CCR3 antibody partially inhibits migration of eosinophils and Th2 cells induced by gp90. Thus, this interaction may contribute to the accumulation of eosinophils and Th2 cells characteristically found in the airways of children with RSV-induced bronchiolitis.

Given the role of CCR3 in RSV pathogenesis, three strategies were tested to prevent RSV infection. 1) Penetration of RSV in the cell is blocked by the natural ligand (eotaxin) of CCR3. RSV infection of epithelial cells is inhibited by pre-treatment with recombinant human eotaxin or neutralizing anti-CCR3 antibody. 2) Prevention of gp90 attachment was obtained by cleaving CCR3 by metalloproteinases (MMP). MMP constitute a multigene family of over 25 secreted endopeptidases, they have the capacity to degrade chemokine receptors, in particular CCR3. Using Western blot and flow cytometric analysis, we report in this study that MMP7 cleaves CCR3 and prevents the binding of eotaxin to its receptor. The cleavage of CCR3 was also reflected in a loss of chemoattractant activity for eosinophils and GHOST/CCR3 cells. In addition, treatment

of epithelial cells with MMP7 inhibited infection with RSV. 3) Finally, CCR3 expression is decreased by glucocorticoides treatment. Pretreatment of the airway epithelial cells line Hep-2 with *fluticasone propionate* (FP) at a concentration of 10^{-7} M decreased viral plaque formation. Moreover, significant inhibition of CCR3 expression was observed when the cells were treated with the 10^{-7} M FP solution.

Our data offers multiple strategies for inhibiting RSV interaction with CCR3 such as its decreased cell surface expression by corticosteroids, its blockade by eotaxin, as well as being cleaved by MMP. These could offer a basis for pharmacological intervention in bronchiolitis and asthma exacerbation caused by RSV.

Keywords : Respiratory syncytial virus, Glycoprotein G, Chemokine, Chemokine receptor, Metalloprotease, Corticosteroides.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	v
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES FIGURES	xi
ABRÉVIATIONS	xiii
DÉDICACES	xvi
REMERCIEMENTS	xvii
INTRODUCTION	1
1. Le Virus Respiratoire Syncytial Humain	2
1.1 Introduction	2
1.2 Les protéines F et G	4
1.2.1 La protéine de fusion F	4
1.2.2 La protéine d'attachement G	5
1.3 L'infection au VRS	8
1.3.1 Les cellules impliquées dans l'infection	9
1.4 VRS et asthme	11
1.5 Traitements et prophylaxie	12
1.5.1 Traitement	12
1.5.1.1 Les corticostéroïdes	12
1.5.2 Prophylaxie	14
2. Exploitation microbiologique du système des chimiokines	18
2.1 Les chimiokines et leurs récepteurs	18
2.1.1 Classification des chimiokines	19
2.1.1.1 Les chimiokines CXCL	20
2.1.1.2 Les chimiokines CCL	20
2.1.1.3 Les chimiokines XCL	21
2.1.1.4 La chimiokine CX3CL	21

2.1.2 Les récepteurs des chimiokines	21
2.1.3 Migration cellulaire	24
2.1.4 Signalisation des récepteurs des chimiokines	25
2.2 Régulation des chimiokines et de leur récepteur par les métalloprotéinases	26
2.3 Récepteurs de chimiokines comme co-récepteurs d'agents microbiens	29
2.4 Récepteurs de chimiokines comme cible de subversion virale	31
2.4.1 Les récepteurs de chimiokines encodés par les virus (vCKR)	32
2.4.2 Les protéines virales neutralisant les chimiokines (vCKBP)	33
2.4.3 Les chimiokines virales encodées par les virus (vCK) et autres protéines virales à activité chimiotactique	33
2.4.3.1 Les protéines du VIH	33
2.4.3.2 Les protéines du VRS	35
3. Objectifs	38
MATÉRIEL ET MÉTHODES	40
1. Réactifs	41
2. Cellules, explants de la muqueuse nasale	41
3. Virus, purification de la forme sécrétée de la glycoprotéine G du VRS (gp90) et infection	43
4. Immunomarquage	44
5. Cytométrie en flux	44
6. Mesure de l'expression de l'ARNmessenger par la rt-PCR	46
7. Immunoprécipitation et Western blot	46
8. Chimiotactisme	47
9. Détermination de la production de mucus chez les cellules A549	48
10. Analyses Statistiques	48
RÉSULTATS	49
1. L'interaction entre le VRS et CCR3	51
1.1 La glycoprotéine G du VRS inhibe la liaison de l'éotaxine aux cellules A549 et GHOST/CCR3	49
1.2 L'infection du VRS est inhibée en bloquant le récepteur CCR3	55

1.3 Le VRS infecte les éosinophiles et les cellules Th2	57
1.4 La gp90 initie le chimiotactisme des cellules Th2 et des éosinophiles	59
1.5 L'induction du mucus par la gp90 du VRS chez les cellules épithéliales A549	60
2. La régulation du CCR3 par les MMP	62
2.1 Effets des MMP sur CCR3	63
2.2 Le clivage de CCR3 par MMP7 inhibe la réponse migratoire cellulaire	65
2.3 Le CCR3 clivé par la MMP7 empêche l'infection des cellules de l'épithélium respiratoire par le VRS	67
3. L'effet d'un glucocorticoïde sur CCR3	68
3.1 Activité antivirale du FP sur les cellules HEp-2 et les explants nasaux	69
DISCUSSION	72
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	88
ANNEXES	92
1. Articles publiés durant le programme de doctorat	93
2. Articles en voie de publication durant le programme de doctorat	93
3. Participations aux congrès durant le programme de doctorat	94
4. Permissions de publication de figures	95
BIBLIOGRAPHIE	96

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :	Récapitulatif des chimiokines (noms communs et noms officiels) connues de mammifères, leur famille respective et leurs récepteurs correspondants.	22
Tableau 2 :	Classification des MMP. Les MMP sont groupées en six classes en fonction de leur structure. Chaque MMP est dénommée par un numéro ou par un nom descriptif en rapport avec ces différentes classes.	27
Tableau 3 :	Inhibition de l'infection au VRS par l'éotaxine et un Ac anti-CCR3.	57
Tableau 4 :	Effets des MMP sur l'infectivité du VRS sur les cellules épithéliales Hep2.	67

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Photo de syncytia provoqués par le VRS dans une culture cellulaire (Hep2). Grossissement 400x. Coloration Hema-3.	3
Figure 2 :	Schéma de la structure du VRS et de son génome représentant la localisation et la taille des 10 cadres ouverts de lecture et leur taille.	4
Figure 3 :	Structure de la glycoprotéine G du VRS.	6
Figure 4 :	Représentation schématique de la réponse de l'épithélium respiratoire suite à une infection par le VRS.	11
Figure 5 :	Interaction des glucocorticoïdes avec leur récepteur.	14
Figure 6 :	Schéma de classification des chimiokines et leurs récepteurs.	19
Figure 7 :	Représentation schématique du récepteur de chimiokine CXCR1.	24
Figure 8 :	Modèle d'activation de récepteurs de chimiokine CCR3 et de la transduction du signal de au niveau de l'éosinophile.	26
Figure 9 :	Schéma des trois différentes stratégies employées par des virus pour détourner le système des chimiokines.	31
Figure 10 :	Différentes étapes de l'infection virale.	32
Figure 11 :	Modèle hypothétique de la liaison du VRS et de sa prise en charge par CX3CR1.	36
Figure 12 :	L'ARNm et la protéine du CCR3 sont exprimées dans différents types de cellules épithéliales et par les éosinophiles.	51
Figure 13 :	La glycoprotéine G du VRS inhibe la liaison de l'éotaxine aux cellules A549 et aux cellules GHOST/CCR3.	53
Figure 14 :	CCR3 s'associe à la protéine G du VRS.	54
Figure 15 :	Infection du VRS chez les cellules exprimant CCR3 et inhibition par l'éotaxine et un Ac anti-CCR3.	56
Figure 16 :	Infection des cellules Th1, Th2 et des éosinophiles par le VRS.	58
Figure 17 :	Réponse chimiotactique des cellules Th2, Th1 et des éosinophiles.	60
Figure 18 :	Mucus induit par la gp90 chez les cellules épithéliales A549.	61
Figure 19 :	Effets des MMP sur la liaison de l'éotaxine ou de MIP1 β .	64

Figure 20 :	CCR3 est un substrat pour MMP7.	65
Figure 21 :	L'effet de MMP7 sur la capacité de liaison de CCR3 des éosinophiles.	65
Figure 22 :	Effets de la MMP7 sur la réponse migratoire des cellules GHOST/CCR3 (a) et des éosinophiles (b) à l'éotaxine.	66
Figure 23 :	Pourcentage d'infection du VRS sur les cellules Hep-2 pré-traitées avec différentes dilutions de FP.	70
Figure 24 :	Moyenne du nombre de formation de plaques sur des biopsies nasales infectées et pré-traitées par le FP.	71
Figure 25 :	Schéma hypothétique de l'action conjuguée des chimiokines et de la gp90 du VRS sur les cellules CCR3 ⁺ .	90

ABRÉVIATIONS

aa	Acide aminé
AB/PAS	Alcian blue / periodic acid Schiff's
Ac	Anticorps
ADN	Acide déoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
BIV	Bovine immunodeficiency virus
CCL	Ligand (chimiokine) de type C-C
CCR _n	Récepteur de chimiokines C-CL _n
CX _n CR _n	Récepteur de chimiokine C-X _n -CL _n
CD _n	Cluster of differentiation
CX _n CL _n	Ligand (chimokine) de type C-X _n -CL _n
DARC	Duffy antigen receptor for chemokines
ERG	Éléments répondants aux glucocorticoïdes
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
ELR	Résidus Glu-Leucine-Arginine
FI-VRS	Formaline inactivated
FP	Propionate de fluticasone
GAG	Glycoaminoglycans
GC	Glucocorticoïdes
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
gp120	Glycoprotéine 120
gp90	Glycoprotéine 90
h	Heure
HBD	Heparin binding domain
ICAM	Intercellular adhesion molecules
Ig	Immunoglobuline
IFN _n	Interféron
IL _n	Interleukine

JNK	c-Jun NH ₂ -terminal kinases
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharides
LT	Lymphocyte T
L-Th _n	Lymphocyte T helper
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MMP _n	Métalloprotéase
MOI	Multiplicity of infection
MPO	Myéloperoxidase
NK	Natural killer
nm	Nanomètre
pb	Paires de base
pF	Protéine de fusion
Protéine L	Large protein
M	Protéine de la matrice
M2	Protéine de la matrice 2
PHA	Phytohémagglutinine
Protéine N	Protéine de la nucléocapside
Protéine NS1	Protéine non structurale 1
Protéine NS2	Protéine non structurale 2
Protéine P	Phosphoprotéine
Protéine F	Protéine de Fusion
Protéine SH	Small hydrophobic protein
PST	Protéines de choc thermique
Ras	Rat sarcoma oncogene
RG	Récepteur des glucocorticoïdes
SP	Substance P
SP-A	Surfactan protein A
Tat	Protéine trans-activatrice
TIMP _n	Tissue inhibitors of metalloprotease

TLR _n	Toll like receptor
TNF _n	Tumor necrosis factor
vCK	Viral chemokine
vCKBP _n	Viral chemokine binding protein
vCKR	Viral chemokine receptor
VIH	Virus de l'immunodéficience humain
VIS	Virus de l'immunodéficience simien
vMIP _n	Viral macrophage inflammatory protein
VRS	Virus respiratoire syncytial

*« Nous ne sommes que le produit de l'adaptation des gènes
pour leur propre réplication »*

Le gène égoïste - Richard Dawkins – 1976

*« Le monde n'a pas été créé une fois pour toute, pour chacun de nous.
Il s'y ajoute au cours de la vie des choses que nous ne soupçonnions pas »*

Albertine disparue – Marcel Proust - 1927

REMERCIEMENTS

Une thèse de doctorat est loin d'être un travail solitaire ; nul ne peut accomplir sa construction en restant isolé dans sa tour d'ivoire. Tout au long de ces années, de nombreux architectes, maçons et charpentiers sont intervenus pour m'aider à élaborer les plans, consolider les fondations et bâtir cette charpente. Support moral, aide scientifique, soutien financier, bref chacun a apporté sa pierre à l'édifice.

Ce programme de thèse a été entamé sous la direction du Dr Bouchaib Lamkhied et sous la co-direction de la Dre Sophie Laberge de septembre 2002 à septembre 2004. À partir de septembre 2004, la thèse fut poursuivie sous la direction du Dre Sophie Laberge et sous la co-direction du Dr Nikolaus Heveker.

Je serai toujours reconnaissant envers Dre Sophie Laberge qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a continuellement apporté son écoute. Également, je maintiendrai toute ma gratitude au Dr Nikolaus Heveker pour ses conseils et sa confiance. Je ne voudrais pas passer sous silence les encouragements de la Dre Carolina Alfieri. Finalement, je remercie le Dr Bouchaib Lamkhied qui, par ses idées et sa vision générale, a permis l'élaboration de ce projet. Merci également aux autres membres du jury pour avoir pris le temps de lire et d'apporter leurs commentaires à cette thèse.

Évidemment, je remercie mes amis qui m'ont continuellement conseillé et des personnes à qui j'ai demandé conseils et qui sont devenus des amis comme David, Fabienne, Janie, Olivia, Philippe, PYM, Séverine, Simon, Sophie, Stéphane, Stéphane, Stéphane, Souad, Sylvette, Vincent, Younès, Younès,

Mes amis d'outre-atlantique,

La famille ElAzhary,

Mes sœurs et leurs familles,

Mes parents,

Julie.

INTRODUCTION

1. Le Virus Respiratoire Syncytial Humain

Le virus respiratoire syncytial (VRS) humain est l'étiologie la plus fréquente des cas de bronchiolite et de pneumonie chez les enfants de moins de 2 ans. La lutte contre l'infection au VRS est l'une des priorités de l'Organisation Mondiale de la Santé puisque la morbidité associée à cette infection en phase aiguë est élevée. De plus, l'infection au VRS peut être associée à plus long terme au développement de l'asthme chez l'enfant. À ce jour il n'existe pas de traitements spécifiques efficaces contre le VRS. La recherche d'un vaccin contre le VRS reste en effet dominée par le spectre d'un accident historique au cours duquel, suite à l'inoculation d'un vaccin inactivé au formol, des enfants ont développé des signes cliniques sévères allant jusqu'au décès. Les mécanismes physiopathologiques associés à l'infection au VRS ne sont que partiellement élucidés. L'étude des mécanismes immunologiques impliqués dans cette réponse infectieuse est essentielle au développement de stratégies de prévention et de traitement.

1.1 Introduction

Le VRS est une cause majeure de l'infection du tractus respiratoire chez les nourrissons et jeunes enfants. Les formes cliniques de l'infection de la maladie du VRS comprennent la rhinite, la bronchiolite, la bronchopneumonie et la pneumonie. Dès l'âge d'un an, 50% des enfants ont été infectés par le VRS et 100% à l'âge de deux ans (Hall et al, 1991). Environ 2% des enfants infectés par le VRS sont hospitalisés et, parmi ceux-ci, moins de 1% décèdent. L'impact économique du VRS est important ; il est estimé à \$340 millions par an aux États-Unis (Wertz and Sullender, 1992) et à 6500\$ par cas d'hospitalisation au Canada (Langley J, 1994).

Le VRS humain a été isolé pour la première fois en 1957 chez des enfants qui présentaient des troubles respiratoires sévères (Chanock and Finberg, 1957). Ce virus reçut sa désignation à cause du type d'effet cytopathogène qu'il induit en culture cellulaire : la formation de syncytia qui est un effet cytopathique caractérisé par un arrondissement des cellules, suivi d'une fusion de celles-ci pour former des cellules géantes multinucléées

(Fig.1). Quelques années plus tard, l'isolement d'un VRS a été décrit chez d'autres mammifères (revue dans : Wellemans, 1992-a-b).

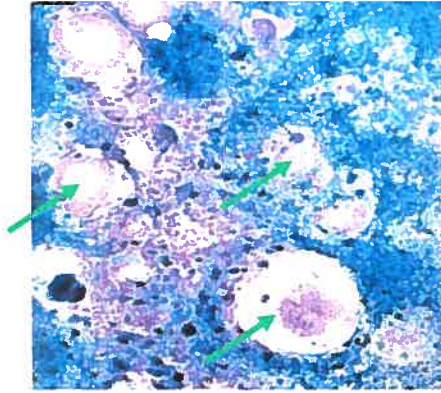
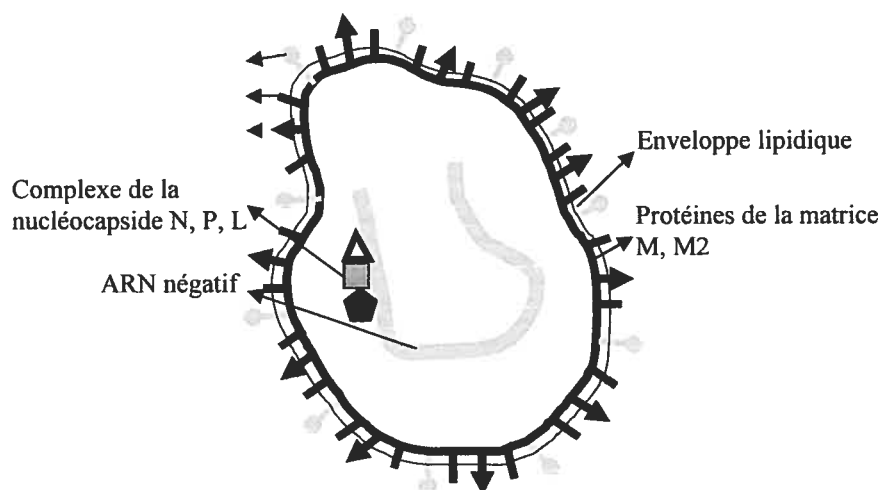


Figure 1 : Photo de syncytia provoqués par le VRS dans une culture cellulaire (Hep2).
Grossissement 400x. Coloration Hema-3. Les flèches présentent des syncytia. La formation de ces syncytia est caractérisée par un arrondissement des cellules, suivie d'une fusion pour former des cellules géantes multinucléées.

Les VRS sont des *Pneumovirus* de la sous-famille des *Pneumoviridae*, appartenant à la famille des *Paramyxoviridae* (Murphy FA et al., 1995). Le virus possède une enveloppe structurée en particules sphériques pléomorphes dont le diamètre varie de 80 à 350nm. Les virions se répliquent dans le cytoplasme et quittent la cellule hôte par bourgeonnement depuis la membrane plasmique. L'enveloppe lipoprotéique contient une nucléocapside de structure hélicoïdale où se trouve le génome viral constitué d'un ARN simple brin de polarité négative, d'une longueur approximative de 15kb codant 10 protéines : 2 protéines non-structurales (NS1, NS2), 3 protéines constituant la nucléocapside (N, L, P), 2 protéines situées à la surface interne de l'enveloppe (M, M2), 3 protéines associées à l'enveloppe (SH, F, G) (Collins et al., 1995; Collins et al., 1996; Huang et al., 1985; Huang and Wertz, 1982). (Fig.2). En se basant sur les caractéristiques antigéniques de la protéine G, les souches du VRS ont été classées en deux groupes principaux, A et B. Ces deux groupes sont eux-mêmes divisés en sous-groupes basés sur leur séquence moléculaire et leur réactivité à des anticorps monoclonaux. Ces sous-groupes circulent conjointement durant les épidémies dans les différentes régions du monde (Storch et al., 1987; Hendry et al., 1986; Hendry et al., 1989). Parmi les protéines constitutives du VRS, les deux protéines immunogènes majeures sont les protéines de fusion F et d'attachement G.



NS	NS2	N	P	M	SH	G	F	M2	L	
14.6	15.5	43.4	27.1	28.7	7.5	32.5	63.5	22.1	250.2	kDa

Figure 2 : Schéma de la structure du VRS et de son génome représentant la localisation et la taille des 10 cadres ouverts de lecture et leur taille.

Le VRS a une taille approximative de 200nm et consiste en une nucléocapside ayant comme enveloppe une bicouche lipidique. La nucléocapside a la forme d'une hélice de 15 Kb codant 10 protéines. La bicouche lipidique dérive de la membrane de l'hôte et contient des glycoprotéines de surface transmembranaires encodées par le virus.

1.2 Les protéines F et G

1.2.1 La protéine de fusion

La protéine (p) de fusion (F) est responsable de la fusion des membranes virales et cellulaires induisant l'internalisation de la nucléocapside virale. Elle provoque également la fusion des cellules infectées conduisant à la formation de syncytia (Walsh and Hruska, 1983).

La pF est une glycoprotéine de type I qui contient 547 acides aminés. Elle est synthétisée sous la forme d'un précurseur F0 de 70 kDa, qui est clivé par une protéase cellulaire, la furine, pour générer deux sous-unités, F1 (48 kDa) et F2 (22 kDa), reliées par un pont disulfure (Fernie et al., 1985; Gruber and Levine, 1985; Huang et al., 1985; Ortmann et al., 1994). La pF est glycosylée post-traductionnellement à l'aide de sucres N-liés (Fernie et al., 1985; Gruber and Levine, 1985). Trois à 4 sites antigéniques intervenant dans la neutralisation sont situés sur la sous-unité F1 et sont conservés entre les groupes A et B du VRS (Walsh et al., 1987). La pF induit une immunité protectrice qui est associée à

l'expression de cytokines de type Th1 par l'hôte (Bright et al., 1995; Srikiatkachorn and Braciale, 1997).

La pF est liée à RhoA, une GTPase de la famille des « Rat sarcoma oncogene » (Ras) qui facilite l'induction de la formation de syncytia dans les cellules Hep-2 (Pastey et al., 1999). Le traitement des Hep-2 par un peptide dérivé de RhoA, inhibe l'infection et la formation de syncytia (McCurdy and Graham, 2003).

Au niveau des macrophages murins, il a été démontré que la pF interagit avec les récepteurs CD14 et TLR4 (Kurt-Jones et al., 2000). Cette association stimule le relargage d'interleukine (IL)1 β , d'IL6, d'IL8 et de « tumor necrosis factor » (TNF) α . Le VRS persiste plus longtemps dans les tissus pulmonaires de souris déficientes en TLR4 comparativement aux souris normales, cette délétion étant associée à un déficit du recrutement et de la fonction des « natural killer » (NK), de la mobilisation des cellules pulmonaires présentant le CD14 ainsi que de l'expression d'IL12 (Haynes et al., 2001).

1.2.2 La protéine d'attachement G

La glycoprotéine G (gp90), exprimée sous une forme membranaire et soluble (gp90s), est responsable de l'attachement du virus au récepteur cellulaire (Hendricks et al., 1988; Levine et al., 1987).

La forme membranaire de la gp90 (glycoprotéine de classe II) a une masse moléculaire de 90 kDa (Fig.3). Lors de sa maturation, la gp90 est modifiée intracellulairement par l'adjonction de sucres N-liés en sucres complexes suivie de l'addition d'oligosaccharides O-liés au niveau de l'appareil de Golgi (Collins, 1990; Lichtenstein et al., 1996; Olmsted and Collins, 1989). La portion extracellulaire de la gp90 est constituée d'une région contenant 4 cystéines conservées (Olmsted and Collins, 1989). Ce domaine s'organise en structure globulaire grâce aux ponts disulfures reliant les cystéines entre elles (Langedijk et al., 1996) et constituerait le site d'attachement au récepteur cellulaire (Johnson et al., 1987). Les données de séquence en acide aminé montrent par ailleurs qu'une portion de cette région est conservée entre les différentes souches (Johnson et al., 1987; Lerch et al., 1990). Plusieurs des épitopes reconnus par les anticorps de l'hôte sont situés dans la région

C-terminale (Walsh et al., 1987) de gp90. Cette protéine est très tolérante à de nombreuses modifications : l'adjonction de séquences étrangères ou la suppression d'importants domaines n'empêchent pas l'expression de ces formes mutées à la surface des cellules infectées (Lichtenstein et al., 1996; Olmsted and Collins, 1989; Roberts et al., 1994).

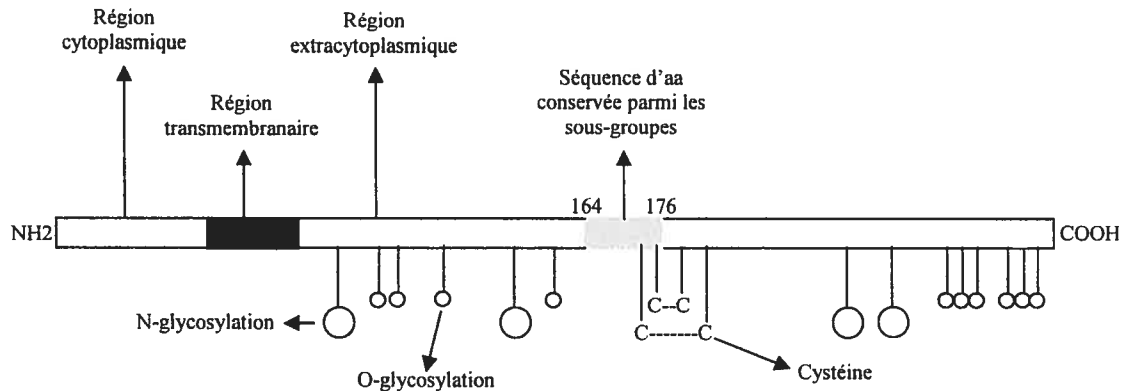


Figure 3 : Structure de la glycoprotéine G du VRS.

Les 298 acides aminés de la gp90 sont représentés sous forme de rectangles nuancés de blanc à noir. Le segment de séquence d'acides aminés conservé entre les deux sous-groupes antigéniques de la gp90 (164-176) est en gris clair. Les sites potentiels de glycosylation sont présentés par soit des grands cercles (N-glycosylation) ou par des petits cercles (O-glycosylation). Les résidus conservés de cystéines sont indiqués par des (C). La région cytoplasmique est séparée de la région extra-cytoplasmique par une zone de couleur noire représentant la région transmembranaire de la gp90.

Environ 15% de la protéine d'attachement est exprimée sous une forme soluble (gp90s) qui a une masse moléculaire approximativement de 85 kDa. C'est l'initiation de la traduction à partir du deuxième codon AUG qui est responsable de la formation de cette gp90s (Hendricks et al., 1988). Ce codon d'initiation, présent dans le domaine hydrophobe de la gp90, engendre un peptide signal dont le clivage permettra l'expression d'une gp90s (Lichtenstein et al., 1996; Roberts et al., 1994). La gp90s est détectée dès 6h postinfection, alors que la forme membranaire n'est détectable qu'à partir de 18h, suggérant un rôle plus précoce du gp90s dans l'interaction avec le système immunitaire de l'hôte (Hendricks et al., 1988). Des expériences ont montré que des souches du VRS sans gp90 membranaire mais exprimant la partie soluble, ont une réplique efficace *in vitro* qui n'est que légèrement atténuée *in vivo* (Bembridge et al., 1998; Johnson et al., 1998). Un virus recombinant dans lequel la gp90 et la gp90s ont été délétées est encore capable d'infecter efficacement les cellules cibles. Ce mutant est toutefois beaucoup moins capable d'infecter les cellules du tractus respiratoire humain et murin (Teng et al., 2001). Ces résultats

indiquent que la gp90 n'est pas essentielle pour l'attachement cellulaire mais agit comme une protéine accessoire laquelle, augmente l'efficacité du processus.

Contrairement à la pF qui est associée à une réponse de type Th1, la gp90 semble être liée à la pathogenèse de l'infection au VRS et responsable de la sévérité de la maladie. En effet, chez les souris, la gp90 induit l'expression de cytokines de type Th2 (IL4 et IL5) (Spender et al., 1998) et d'une éosinophilie pulmonaire (Arnold et al., 2004; Hancock et al., 1996; Takeuchi et al., 2004; Tebbey et al., 1998). La gp90 est par ailleurs associée à une réduction de neutrophiles, du trafic des NK ainsi qu'à une diminution de la concentration d'IL2 au niveau du poumon (Tripp et al., 1999). Le traitement de cellules mononucléées par la gp90 purifiée induit la production d'IL10 et diminue l'expression de TNF α et d'IL12 (Konig et al., 1996). La gp90s peut induire la production d'IL5 et d'IL13 ainsi que l'accumulation d'éosinophiles pulmonaires (Johnson and Graham, 1999; Johnson et al., 1998). L'exposition à la gp90 aggrave les symptômes chez les souris confrontées au VRS et inhibe l'expression des ARNm codant pour CCL2, -3, -4 et CXCL10 par les leucocytes bronchoalvéolaires (Tripp et al., 2000). L'infection de souris par un virus de la vaccine exprimant la gp90 génère une réponse inflammatoire caractérisée par le recrutement de lymphocytes T-CD4 de type Th2 et une éosinophilie pulmonaire (Alwan and Openshaw, 1993; Pemberton et al., 1987). Le transfert de clones de lymphocytes T-CD4 spécifiques à la gp90 chez des souris naïves les prédispose à une pathologie pulmonaire et à une maladie plus prononcée après une confrontation au VRS (Alwan et al., 1994). Ces données suggèrent que la structure antigénique de la gp90 prédispose à une réponse immune de type Th2 subséquente à une infection au VRS. L'identification de la séquence peptidique de la gp90 responsable de la réponse de type Th2 est encore sujette à débats (Sparer et al., 1998; Srikiatkachorn et al., 1999). Cependant, le développement de cette réponse de type Th2 peut expliquer en partie l'association entre le VRS et le développement ultérieur de l'asthme chez les individus prédisposés.

Le récepteur cellulaire de la gp90 n'a pas été identifié. Le groupement héparine sulfate des glycosaminoglycans et les chondroïtines sulfates B de la surface cellulaire facilitent l'infection par un domaine de liaison putatif d'héparine présent au niveau de la gp90 (« heparin binding domain » : HBD) (Feldman et al., 1999). Une mutation de HBD, ne

modifie pas la croissance du VRS *in vitro* et le virus reste sensible à la neutralisation de l'héparine soluble même s'il montre, *in vivo*, une réduction moyenne de l'infection. La région HBD de la gp90 ne serait donc pas le seul déterminant lié à la liaison cellulaire (Karron et al., 1997; Teng et al., 2001). De manière intéressante, la région HBD a d'autres fonctions vu qu'elle contient un motif commun au CX3C de la chimiokine CX3CL1 (Tripp et al., 2001). Toutefois, la séquence peptidique de la gp90 ne présente que peu d'homologie avec CX3CL1. Cette région centrale conservée de la gp90 ne serait pas requise pour une infection efficace *in vitro* (Teng et al., 2001).

En conclusion, ces observations suggèrent que la protéine de surface G du VRS joue un rôle important dans la maladie respiratoire et sa pathogénèse mais selon un processus qui reste encore à définir. De même, les mécanismes d'attachement de la gp90 membranaire ainsi que le récepteur ne sont pas clairement identifiés. La dissection moléculaire sous-jacente à l'immunopathologie de la gp90 offrirait un nouvel aperçu dans le traitement possible du VRS et de ses complications.

1.3 L'infection au VRS

L'infection au VRS est saisonnière avec une prédominance du nombre de cas en hiver et au début du printemps dans les climats tempérés (Mufson et al., 1973). Le VRS est très contagieux et se répand principalement par contact direct (main-yeux, main-nez) ou par sécrétion nasale (Jeng and Lemen, 1997).

Après une période d'incubation de 4 à 5 jours, le virus se répand du naso-pharynx au tractus respiratoire inférieur *via* l'aspiration de sécrétions ou *via* les cellules de la muqueuse épithéliale respiratoire (Johnson et al., 1961). L'infection induit des nécroses de l'épithélium bronchiolaire, une formation de syncytia et un infiltrat péribronchiolaire de lymphocytes associés à un œdème (Fujishima et al., 1995). Il s'ensuit une augmentation de la production de mucus. L'accumulation de mucus, les dommages épithéliaux et l'infiltrat cellulaire engendrent l'obstruction des petites voies respiratoires, menant à une difficulté respiratoire et de la respiration sifflante (Ottolini and Hemming, 1997). Dans une

bronchiolite typique au VRS, il y a relativement peu de cellules infectées suggérant que la maladie est principalement liée à la réponse inflammatoire induite par le virus et non pas reliée aux effets cytopathiques (Aherne et al., 1970).

Comme le VRS est un pathogène ubiquitaire et que la majorité des enfants sont infectés durant leurs deux premières années de vie, la plupart des individus ont des anticorps sériques anti-VRS. Les nouveau-nés, pour leur part, ont un niveau d'anticorps maternels anti-VRS élevé (Hall et al., 1991). Néanmoins, l'incidence des réinfections reste élevée suggérant une protection incomplète et de courte durée. Des anticorps sécrétés et sériques sont produits suite à l'infection, mais le niveau des anticorps anti-F et G des nourrissons ne présente que 20% de celui des individus adultes (McIntosh et al., 1978). La faiblesse de cette réponse serait peut-être liée à la présence d'anticorps maternels et/ou à l'immaturation du système immunitaire de l'enfant (Murphy et al., 1986a). Les manifestations cliniques des réinfections sont généralement plus faibles que celles de la primo-infection et restent le plus souvent limitées, bien que des enfants immunodéprimés puissent développer une infection sévère (Glezen et al., 1986; Groothuis et al., 1990).

1.3.1 Les cellules impliquées dans l'infection

Les cellules de l'épithélium respiratoire sont les premières cibles cellulaires du VRS (Hall et al., 1981) (Fig.4). L'infection des cellules épithéliales induit une libération des cytokines proinflammatoires (IL1, TNF α , IL6, IL11), de chimiokines (CXCL8, CCL2, -3, -5), de facteurs de croissance (GM-CSF et G-CSF) et d'interférons (IFN α , IFN β) (revue dans : McNamara and Smyth, 2002). De plus, le VRS induit une expression accrue de molécules d'adhésion (ICAM1) au niveau des cellules alvéolaires (Patel et al., 1995). Ces mêmes cellules infectées produisent des protéines du complément (Zach et al., 1992) et du surfactant (Korfhagen and Whitsett, 1997).

L'infiltrat inflammatoire au niveau des voies aériennes est composé principalement de lymphocytes, de neutrophiles et d'éosinophiles. Les médiateurs produits par ces cellules contribuent à la pathogenèse de l'infection. La protéine du surfactant est un polypeptide qui favorise la fonction de phagocytose des neutrophiles et des macrophages (Holmskov et al., 1994; Midulla et al., 1993). En réponse à l'infection, les macrophages alvéolaires

produisent des cytokines pro-inflammatoires (IL1 β , IL6, CXCL8, IL10, IL12, TNF α) (Becker et al., 1991; Panuska et al., 1995). Les premiers jours post-infection, la majorité des lymphocytes identifiés dans le lavage broncho-alvéolaire de souris sont de phénotype NK (Hussell and Openshaw, 1998). Les chimiokines CCL2, -3, -4, -5, -7, -8, produites par les cellules épithéliales infectées, ont des fonctions de chimiotactisme, de stimulation de la prolifération et de cytotoxicité des NK qui sont responsables de la production précoce d'IFN γ (Becker and Soukup, 1999; Biron et al., 1999). L'infiltrat neutrophilique survient précocement après l'infection et est attribuable à l'effet chimiotactique du CXCL8 provenant des cellules épithéliales et des macrophages (Wang and Forsyth, 2000). Les neutrophiles produisent le CXCL8, les CCL3, -4 et une myéloperoxidase (MPO) spécifique associée aux granules (Jaovisidha et al., 1999). Des concentrations élevées de MPO sont observées dans des sécrétions nasopharyngées de nourrissons atteints de bronchiolite (Hubner et al., 2005).

Les éosinophiles, attirés par les chimiokines (CCL3, -5, -11) produites par les cellules épithéliales infectées sont activés (Olszewska-Pazdrak et al., 1998b) et peuvent être directement infectés par le VRS. Sur place, ils libèrent leurs protéines granulaires cytotoxiques ce qui aggrave la destruction épithéliale et augmente la pathologie (Soukup and Becker, 2003) ainsi que la production de radicaux d'oxygène, leukotriène C4, CCL3, -5. La concentration de protéines cationiques éosinophiliennes dans le sérum et les sécrétions nasopharyngées sont un marqueur de sévérité de la maladie (Garofalo et al., 1992).

Ainsi, les manifestations cliniques d'une bronchiolite au VRS résultent non seulement d'un effet cytopathique direct du virus mais également de la réponse inflammatoire de l'hôte caractérisée par une accumulation d'éosinophiles, de neutrophiles et de lymphocytes T de type Th2. Elle est aussi caractérisée par une production excessive de mucus par les voies respiratoires. Actuellement, il n'est pas encore bien défini si ces phénomènes excessifs sont la conséquence du relargage de chimiokines induites par le VRS ou sont dus directement au VRS *via* sa gp90 selon un mécanisme non encore élucidé.

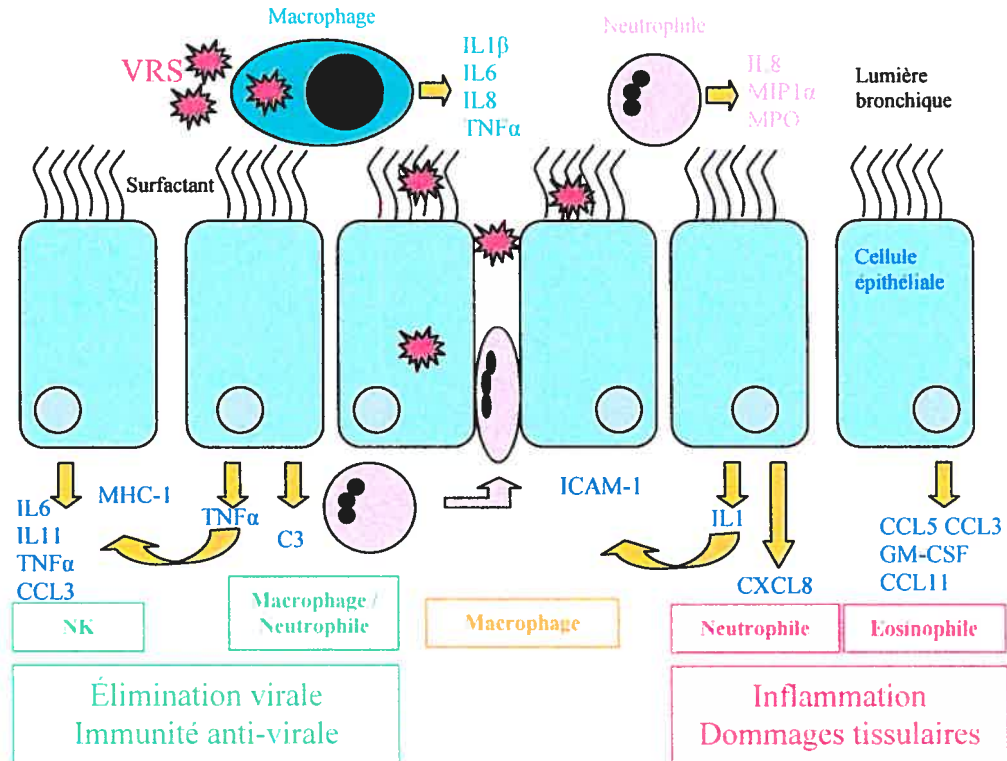


Figure 4 : Représentation schématique de la réponse de l'épithélium respiratoire suite à une infection par le VRS.

Le VRS est lié par le surfactant et est phagocyté par les macrophages lesquels mènent à la production de cytokines. L'infection des cellules épithéliales stimule la relâche de nombreuses cytokines et chimiokines. Celles-ci mènent à la régulation à la hausse de ICAM-1 et de MHC-1. Ces éléments déterminent l'élimination du virus et/ou l'inflammation avec des dommages des tissus de la muqueuse respiratoire.

1.4 VRS et asthme

L'asthme (*asthma* : respiration difficile) est une maladie inflammatoire chronique des voies aériennes, apparaissant généralement au cours des premières années de la vie, responsable de symptômes divers (dyspnée paroxystique sifflante, essoufflement, sensation d'oppression thoracique, toux) et caractérisée par une insuffisance respiratoire de degré variable (Kips, 2001). Le processus inflammatoire se caractérise par une accumulation, au niveau de la paroi bronchique, d'éosinophiles, de lymphocytes T de type CD4 et CD8, de lymphocytes B, de macrophages, de cellules dendritiques, de mastocytes et de plaquettes (Muro et al., 2000). Différentes études épidémiologiques ont rapporté une augmentation de la prévalence de l'asthme au cours des trente dernières années qui se situe entre 2,1 et 32,2 % (Masoli et al., 2004).

Les facteurs de risques liés au développement de l'asthme sont classifiés en deux catégories : l'hôte (facteurs génétiques, atopie, genre, race) et l'environnement (polluants, exposition aux allergènes, fumée de cigarette, obésité, infections respiratoires) (Message and Johnston, 2002; Pearce et al., 1999; Sears et al., 1993; Wills-Karp and Ewart, 2004).

Les infections respiratoires ont une relation complexe avec le développement de l'asthme. Plusieurs études épidémiologiques suggèrent qu'une prévalence accrue d'infections respiratoires en bas-âge protégerait contre le développement de l'asthme (Erb, 1999; Yazdanbakhsh et al., 2002). Par contre, l'infection au VRS semble être un facteur de risque important pour le développement de l'asthme juvénile (revue dans : Osur, 2002; Sigurs, 2001). L'explication possible de ce mécanisme pathogénique est que le virus est capable de déréguler l'immunité locale. Les travaux de Welliver et al (Welliver et al., 1986), suggèrent que cette dérégulation se manifeste par la production d'un haut titre d'anticorps IgE spécifique au VRS. Également, l'infection au VRS crée un déséquilibre entre les populations lymphocytaires Th1 et Th2 favorisant l'inflammation allergique médiée par les lymphocytes Th2 et par une accumulation excessive d'éosinophiles au niveau pulmonaire caractéristique des l'inflammation asthmatique (Lemanske, 2002).

1.5 Traitements et prophylaxie

1.5.1 Traitement

Il n'existe aucun traitement efficace de l'infection au VRS. La thérapie actuelle consiste en un traitement de support incluant une hydratation adéquate, en l'oxygénothérapie et en l'aspiration des sécrétions nasopharyngées associée ou non à de la kinésithérapie (revue dans : Black, 2003). La ribavirine, qui est un agent virostatique, diminue le titre viral mais ne réduit pas l'infiltrat granulocytaire (Schmidt et al., 2004) ; son utilisation n'est donc pas recommandée de façon générale (Black, 2003).

1.5.1.1 Les corticostéroïdes

Les corticostéroïdes sont communément prescrits pour le traitement de bronchiolites durant la phase aiguë et la période de convalescence (Powell and Gibson, 2003; Price, 2000; Thomas et al., 2002) ainsi que pour le traitement de l'asthme (Connett and Lenney, 1993).

Toutefois, les bénéfices réels des corticostéroïdes sont mitigés si bien que leur utilisation générale n'est pas souhaitable. Certaines études ont montré que cette thérapie est efficace soit dans le cas de certains sous-groupes de patients infectés soit pour les patients présentant une atteinte sévère (Black, 2003; Maggon and Barik, 2004). La thérapie conduit à une réduction du nombre de cellules inflammatoire dans le tractus respiratoire des asthmatiques et par une inhibition de l'expression des médiateurs pro-inflammatoires par les cellules inflammatoires nouvellement recrutées (Jahnsen et al., 1999). Une forte dose de corticostéroïdes inhalés est une stratégie d'une efficacité partielle pour le traitement d'une insuffisance respiratoire virale chez les enfants (McKean and Ducharme, 2000; Powell and Gibson, 2003). *In vitro*, les corticostéroïdes tels que le *propionate de fluticasone* diminuent la production de CXCL8 et CCL5 par les cellules bronchiques épithéliales infectées par le VRS. Toutefois, le traitement n'est pas associé à des variations significatives de la quantité de virus excrétés (Noah et al., 1998).

Une compréhension de base des mécanismes moléculaires est utile lorsqu'on veut évaluer l'effet thérapeutique et systémique des corticostéroïdes. La dose inoculée, les patients, la pathologie et les cellules ciblées peuvent modifier une réponse individuelle aux glucocorticoïdes (GC) (Crowley, 2003). En l'absence de ligand, le récepteur(RG) des GC est séquestré dans le cytoplasme et maintenu sous forme inactive par association à des protéines de choc thermique (PST). La liaison du ligand induit un changement conformationnel du RG qui relargue les PST et est phosphorylé puis déplacé vers le noyau. Il se fixe alors sous forme d'homodimère sur des séquences spécifiques, des éléments répondants aux glucocorticoïdes (ERG), localisées dans les régions régulatrices des gènes cibles et active (transactivation/ERG+) ou réprime (transrépression/ERG-) la transcription de gènes. La transrépression se déroule soit en se liant à ces ERG-, soit par l'interaction directe des RG avec des facteurs de transcription nucléaire (McKay and Cidlowski, 1999; Crowley, 2003; Kofler et al., 2003). Le facteur commun de l'activité des GC est donc la régulation des gènes de transcription et la mesure de ce potentiel transcriptionnel prédit le pouvoir anti-inflammatoire et les effets secondaires (Jaffuel et al., 2000). Par exemple, une augmentation de l'activité transrépressive et une diminution concomitante des propriétés transactivatrices impliquent des effets secondaires mineurs. L'index thérapeutique des GC inhalés dépend du ratio thérapeutique / effets systémiques non désirés et dépend de son

activité potentielle locale et semblent restreints à certains tissus ou types cellulaires (Brostjan et al., 1996; Jaffuel et al., 2000; Crowley, 2003) (Fig.5).

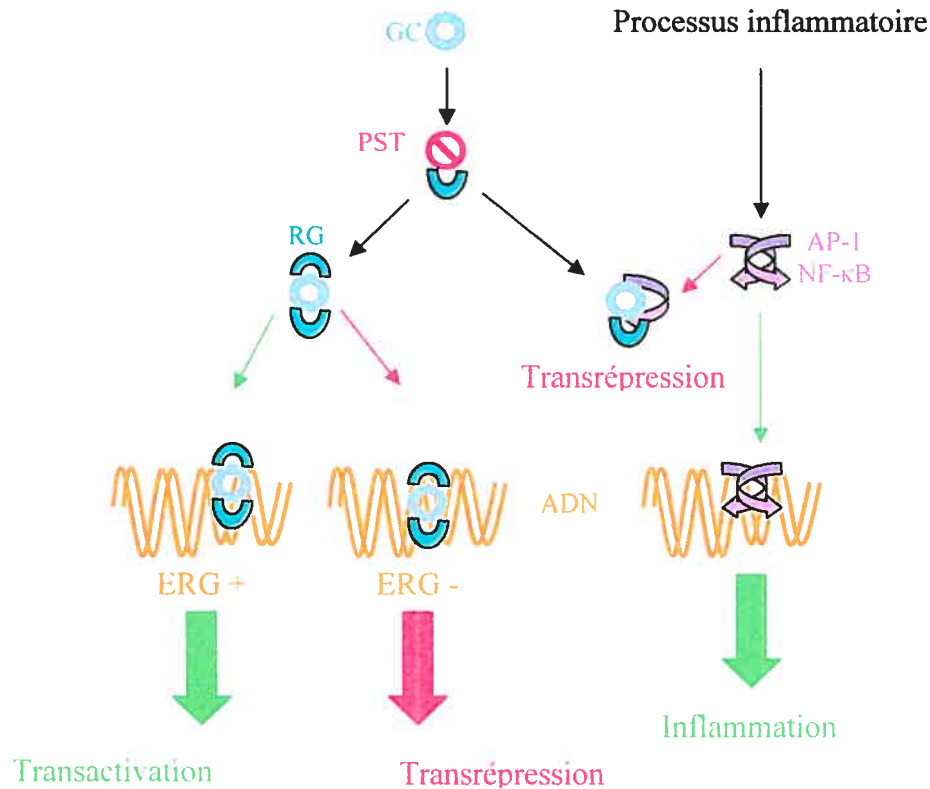


Figure 5 : Interaction des glucocorticoïdes (GC) avec leur récepteur (RG).

Cette activation peut à la fois activer (transactivation) ou réprimer (transrépression) la transcription du gène. La liaison du complexe GC/RG à des éléments répondant aux glucocorticoïdes (ERG+) localisés sur l'ADN résulte en une transactivation, responsable de beaucoup d'effets métaboliques. La transrépression se déroule par deux mécanismes : la liaison du complexe GC/RG à des ERG- ou par une interaction directe avec des facteurs de transcription nucléaire comme AP-1 et NF-κB. La transrépression est responsable des effets anti-inflammatoires de GC.

1.5.2 Prophylaxie

La prévention est un objectif prioritaire en milieu hospitalier où les mesures « classiques » d'hygiène prennent toute leur importance. L'allaitement doit être encouragé car la maladie est moins sévère chez les nourrissons nourris au sein. Pour les enfants à risque, une immunothérapie à base d'anticorps monoclonal (le palivizumab) dirigé contre la protéine F est recommandée. L'administration d'immunoglobulines intraveineuses anti-VRS ont fait l'objet de plusieurs études et l'incidence de l'hospitalisation pour infection à VRS a alors été réduite (revue dans : Black, 2003; Maggon and Barik, 2004). Les indications de cette

prophylaxie sont clairement établies dans les recommandations de la Société Canadienne de Pédiatrie et de l'American Academy of Pediatrics.

À ce jour il n'existe pas de vaccination qui protège les jeunes enfants contre des infections sévères du VRS. Après le succès du vaccin contre la poliomyélite préparé à partir du virus entier, inactivé par la formaline, un processus similaire a été utilisé pour préparer un vaccin contre le VRS. Durant l'hiver 66-67, des enfants, séronégatifs pour le VRS, furent immunisés par le vaccin inactivé (FI-VRS) ou par un vaccin contrôle. Ils furent ensuite exposés au VRS dans leur communauté. Mais, plutôt que d'être protégés, les enfants immunisés avec le FI-RSV développèrent la maladie de façon plus aiguë, pouvant aller jusqu'au décès. L'examen des malades révéla une intense infiltration péribronchiolaire, une sévère inflammation pulmonaire ainsi qu'un excès d'éosinophiles dans le sang et les poumons (Kapikian et al., 1969; Kim et al., 1969). Différentes hypothèses ont été soulevées pour expliquer les effets adverses de ce vaccin. Les séra des enfants vaccinés par le FI-VRS contenaient de hauts titres d'anticorps contre les protéines F et G mais relativement peu neutralisants. Il a été proposé que l'inactivation par la formaline altérerait les épitopes protecteurs et empêcherait les anticorps de contrôler la réplication virale (Hall et al., 1976; Russi et al., 1993). Ces anticorps pourraient également se lier aux antigènes viraux, former des complexes immuns dans les poumons et seraient responsables des affections pulmonaires (Murphy et al., 1986b). Paradoxalement, les lymphocytes T ont été impliqués dans l'augmentation de la maladie observée avec la vaccination FI-RSV (revue dans : Hussell and Openshaw, 1996). Précisément, différentes expériences suggèrent que les lymphocytes T de type CD4 sont responsables de la pathologie (Alwan et al., 1992; Connors et al., 1994; Connors et al., 1992). De plus, le vaccin FI-VRS se caractérise par une induction rapide, prolongée et intense de la production de chimiokines qui recrutent et activent les éosinophiles (Alam et al., 1993; Kameyoshi et al., 1992; Matthews et al., 2005; Power et al., 2001a; Rot et al., 1992; Rothenberg, 1999). Il est possible que ces granulocytes aient contribué aux dommages cellulaires par le relargage de leur protéines granulaires cytotoxiques et par la production de radicaux d'oxygène, leukotriène C4, CCL3, -5 qui auraient aggravé la destruction épithéliale et auraient augmenté la pathologie (Soukup and Becker, 2003).

Les premiers vaccins vivants atténués anti-VRS n'ont pas donné de résultats satisfaisants. Les mutants sélectionnés par culture à basse température ou par sélection de mutants thermosensibles étaient soit incomplètement atténués et induisaient des troubles respiratoires, soit trop atténués et ne protégeaient pas (Brandenburg et al., 2001; Greenberg and Piedra, 2004). D'autres constructions furent testées où il a été observé une augmentation de plus de quatre fois du titre d'anticorps séro-neutralisants mais des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si ces préparations peuvent induire une immunité protectrice contre le VRS sauvage (revue dans : Karron et al., 2005).

Les vaccins sous-unitaires, composés de protéines virales purifiées, sont composés de la pF (Falsey and Walsh, 1996; Falsey and Walsh, 1997; Plotnicky-Gilquin et al., 2000), d'une co-purification des protéines M, F et G (Power et al., 1997), ou d'un peptide de la gp90 (Power et al., 2001b). Dans les populations vaccinées, les vaccins ont été bien tolérés et aucune augmentation de la maladie ne fut observée (revue dans : Polack and Karron, 2004). Une alternative pour protéger les nouveau-nés serait de vacciner les femmes enceintes, puisque durant la première saison de VRS, aucune augmentation de la fréquence ou de la sévérité de la maladie n'a été observée chez les nouveau-nés (Munoz et al., 2003).

Dans un modèle animal, la vaccination avec de l'ADN exprimant la protéine F ou G peut protéger contre une infection du VRS sans augmentation significative de la pathologie pulmonaire après une confrontation au VRS (Bembridge et al., 2000a; Bembridge et al., 2000b; Li et al., 2000; Li et al., 1998; Schmidt et al., 2002). Des souris immunisées par voie intradermique par *gene-gun*, qui consiste à administrer une faible quantité de plasmide précipité sur des particules d'or accélérées par un champ électrique, avec un ADN codant pour la gp90 produisent des anticorps associés à une réponse cellulaire de type Th2 qui pourrait être modulée par la co-immunisation d'ADN encodant l'IL-2 ou l'IFN γ (Bartholdy et al., 2004).

En conclusion, le développement d'un vaccin anti-VRS efficace et sécuritaire dépend d'une meilleure compréhension de l'immunobiologie du VRS. Beaucoup de nouvelles informations sur le VRS et sa pathogenèse ont émergé ces dernières années mais plusieurs questions importantes doivent être élucidées. En particulier, il serait opportun de déterminer le récepteur le plus important lors de l'entrée virale et de l'utiliser comme cible

pour interférer avec la pénétration du virus. Des données supplémentaires, tant moléculaires que cellulaires, sur l'induction de l'inflammation et plus particulièrement le rôle de la gp90 dans la réponse immune sont également nécessaires. Dans ce cadre, il serait nécessaire de soulever la place de la gp90 dans l'induction ou l'interférence de la production de cytokines ou de chimiokines. Les mécanismes sous-jacents qui permettent à la gp90 de moduler la réponse des cellules immunitaires lors d'une infection au VRS seraient intéressent à être évalués et élucidés. Ces informations seraient primordiales pour la prévention et la thérapie d'une infection liée au VRS.

2. Exploitation microbiologique du système des chimiokines

Virtuellement chaque type de molécule exposée à la surface d'une cellule est un récepteur de pathogène potentiel. Par exemple, des récepteurs de chimiokines peuvent servir de co-récepteurs pour le *plasmodium vivax* (Horuk et al., 1993b) et le virus de l'immunodéficience humaine (Berger, 1997). Actuellement un tel récepteur, exploitant également cette voie moléculaire pour infecter une cible cellulaire, a été identifié pour le VRS (Tripp et al., 2001). Cependant d'autres récepteurs de chimiokines pourraient être impliqués dans l'attachement viral. Aussi, cette interaction spécifique entre certaines protéines virales et le système de chimiokines permet au virus de détourner le système immunitaire de l'hôte dont les chimiokines assurent le développement (revue dans : Alcamí, 2003).

2.1 Les chimiokines et leurs récepteurs

Pour que le système immunitaire soit efficace dans sa lutte contre les infections ou lors de réactions inflammatoires, les leucocytes doivent migrer de la circulation sanguine vers les tissus où ils exercent leur rôle sous la libération de médiateurs spécifiques. Ces médiateurs constituent un groupe complexe composé de facteurs de croissance, de cytokines et de chimiokines (Borish and Steinke, 2003; Stein and Nombela-Arrieta, 2005). Cette dernière famille, dont le nom est la réunion de deux mots anglais *chemoattractant* et *cytokine*, contrôle le trafic des leucocytes en réponse à un gradient de concentration créé en s'immobilisant à la surface des cellules endothéliales. Les chimiokines sont impliquées dans des activités leucocytaires comme le maintien de l'homéostasie, telle la différenciation, et l'inflammation ou l'activation (Borish and Steinke, 2003; Gangur et al., 2002; Laing and Secombes, 2004; Mackay, 2001). Outre leur rôle de pivot dans la réponse immunitaire contre les pathogènes, les chimiokines régulent la migration des cellules somatiques ainsi que des événements extérieurs au système immunitaire comme, l'angiogenèse, l'organogenèse et la carcinogenèse (revue dans : Borish and Steinke, 2003; Gangur et al., 2002; Murdoch and Finn, 2000a; Murdoch and Finn, 2000b).

2.1.1 Classification des chimiokines

Les chimiokines appartiennent à une large famille de protéines structurellement proches de 8 à 14 kDa. Jusqu'à présent, 50 chimiokines et près de 30 récepteurs ont été identifiés chez l'homme. Fonctionnellement, les chimiokines sont classées en deux catégories (revue dans : Laing and Secombes, 2004; Mackay, 2001; Murdoch and Finn, 2000a; Stein and Nombela-Arrieta, 2005). Les chimiokines *homéostatiques* sont produites et sécrétées *constitutivement* et sont généralement impliquées dans le trafic des lymphocytes et la surveillance immunitaire. D'autres chimiokines, dites *inflammatoires*, sont induites durant une infection ou suivant un stimulus pro-inflammatoire et dirigent la migration des leucocytes au site d'infection. Ces chimiokines recrutent dans le torrent circulatoire et les tissus les cellules participant au phénomène inflammatoire. Lors de la réparation des plaies, ces mêmes chimiokines sont impliquées soit dans l'accumulation de neutrophiles, soit dans la coagulation sanguine. Structurellement, les séquences en acides aminés des chimiokines varient de 20 à 80% et sont caractérisées par la présence d'un motif de 3 ou 4 cystéines (C) (Fig.6). La position amino-terminale de deux de ces cystéines (contiguës ou non) dans la structure de la chimiokine définit la famille du ligand (L). Ainsi, le groupe des CXCL (α), présente un acide aminé intercalé entre les deux cystéines, alors que dans le groupe des CCL (β), les deux cystéines sont adjacentes. La majorité des chimiokines est contenue dans ces deux groupes. Il existe également le groupe CL (γ) qui ne possède qu'une cystéine et le groupe CX₃CL (δ) où les deux cystéines sont séparées par 3 acides aminés variables (Fernandez and Lolis, 2002; Murphy et al., 2000; Rosenkilde and Schwartz, 2004).

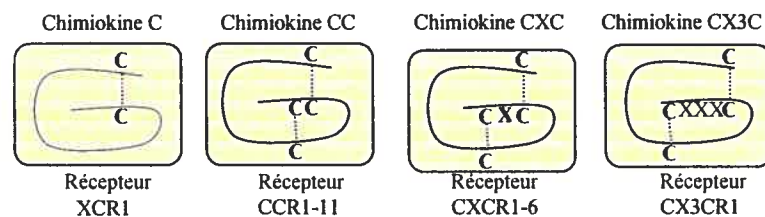


Figure 6 : Schéma de classification des chimiokines et leurs récepteurs.

Les chimiokines sont caractérisées par la présence d'un motif de 3 ou 4 cystéines (C). La position amino-terminale de deux de ces cystéines (contiguës ou non) dans la structure de la chimiokine définit la famille du ligand en XC, CC, CXC et CX₃C.

2.1.1.1 Les chimiokines CXCL

Un motif de trois résidus Glu-Leu-Arg (ELR), adjacent au motif CXC, a été identifié dans certaines chimiokines de ce groupe.

Les *ELR*⁺ comprennent les chimiokines CXCL1, -2, -3, -5, -6 -7, -8 et -15 (Murphy et al., 2000). Elles sont produites par une large variété de cellules en réponse à des stimulants pro-inflammatoires (IL1, TNF α). Le rôle de ces chimiokines est de promouvoir l'adhérence aux cellules endothéliales ainsi que la migration des leukocytes, suggérant leur rôle majeur dans des inflammations aiguës et chroniques. Elles contribuent aussi à la mobilité des mégacaryocytes, des cellules musculaires lisses, des cellules endothéliales et des fibroblastes (Larsen et al., 1989; Warringa et al., 1991; White et al., 1989). Ces chimiokines sont également considérées comme angiogéniques (Strieter et al., 1995).

Les CXCL4, -9, -10, -11, -12, -13, -14 et -16 ne contiennent *pas le motif ELR* (Fernandez and Lolis, 2002). Leur activité biologique est plus variable bien que la plupart soient angiostatiques et aient des propriétés anti-angiogéniques (Cole et al., 1998; Crisi et al., 1996; Gengrinovitch et al., 1995). Elles sont exprimées de façon plus constitutive et exercent leur action sur les lymphocytes et les cellules hors du compartiment hématopoïétique (Borish and Steinke, 2003).

2.1.1.2 Les chimiokines CCL

Selon leurs activités spécifiques et/ou leurs similarités de séquences, la sous-famille CCL peut être divisée en sous-groupes.

Le sous-groupe *allergénique* est composé de molécules structurellement proches (CCL1, -2, -7, -8, -11, -13) dont les gènes sont situés dans la même région du chromosome 17. Elles ont une activité pléiotropique mais attirent généralement les éosinophiles, les basophiles, les mastocytes et peuvent rapidement induire leur dégranulation (Luster and Rothenberg, 1997; Oppenheim JJ, 2000).

Les gènes des chimiokines *pro-inflammatoires* (CCL3, -4, -5, -6 et -8) se trouvent dans une même région du chromosome 17. CCL5 attire préférentiellement les lymphocytes (L)T mémoire, les éosinophiles, les basophiles et induit la relâche d'histamine (Oppenheim JJ, 2000). CCL3 et CCL4 attirent les monocytes tandis que les macrophages, les LTCD4 et les

éosinophiles sont les principales cibles de CCL6 (Asensio et al., 1999; Hogaboam et al., 1999). CCL18 serait impliquée dans l'attraction des LT naïfs (Oppenheim JJ, 2000).

Le sous-groupe du *développement* comprend, entre autres, CCL25 qui présente une activité chimiotactique envers les monocytes, les cellules dendritiques, les thymocytes (Laing and Secombes, 2004).

CCL19, -20 et -21 du groupe *homéostatique* sont produites constitutivement par le tissu lymphoïde. CCL21 redirige les LT naïfs ainsi que les cellules dendritiques matures au site spécifique dans les tissus lymphoïdes (Laing and Secombes, 2004).

2.1.1.3 Les chimiokines XCL

Les chimiokines XCL sont des peptides structurellement similaires aux chimiokines CCL avec l'exception qu'il leur manque une des deux cystéines N-terminales (en l'occurrence la troisième). Cette famille est représentée par deux membres : XCL1/lymphotactine- α et XCL2/lymphotactine- β . XCL1- α peut induire le chimiotactisme des lymphocytes mais pas celui des monocytes ni des neutrophiles (Hedrick and Zlotnik, 1998; Kelner et al., 1994).

2.1.1.4 La chimiokine CX3CL

CX3CL1, seul membre de cette famille, a une activité de chimiotactisme sur les LT, les monocytes et les cellules NK (Combadiere et al., 1998a). Elle induit le relargage de produits neuraux comme la substance P et de la microglie auxquels elle se lie (Lai et al., 2002). Cette chimiokine, tout comme CXCL16, est ancrée, par une large queue de mucines, à la partie C-terminale d'une hélice- α trans-membranaire. Ceci permet à ces chimiokines de rester attachées à la membrane ou d'être sécrétées de la cellule suite à un clivage enzymatique (Combadiere et al., 1998a) (Tableau 1).

2.1.2 Les récepteurs des chimiokines

Toutes les chimiokines identifiées à ce jour régulent leur activité *via* des récepteurs ancrés à la surface des cellules possédant 7 domaines trans-membranaires couplés à une protéine G (Fernandez and Lolis, 2002; Pierce et al., 2002). Un modèle structural du récepteur des chimiokines a été suggéré, basé sur une analogie avec un récepteur de la rhodopsine lequel est également un récepteur à 7-régions-transmembranaires. En fait, la partie N-terminale du

récepteur est localisée au niveau extracellulaire, alors que le domaine C-terminal est intracellulaire et initie la cascade de signalisation faisant suite à la liaison de la chimiokine à son récepteur. Chacun des 7-domaines trans-membranaires passe à travers la membrane, formant des boucles extracellulaires et intracellulaires (Baldwin, 1993) (Fig.7). Les récepteurs des chimiokines sont exprimés sur les cellules de manière constitutive ou après stimulation. Alors que la densité d'expression de la plupart des récepteurs de chimiokines est relativement faible (1000 à 20000 par cellule), CCR3 est fortement exprimé par les éosinophiles (40000 à 50000 par cellule).

Famille	Nom officiel	Nom commun	Récepteur	Famille	Nom officiel	Nom commun	Récepteur	
CXC (α)	CXCL1	GRO α	CXCR2, CXCR1, DARC		CCL9	MIP1 γ	?	
	CXCL2	GRO β	CXCR2		CCL10	CCL10	?	
	CXCL3	GRO γ	CXCR2		CCL11	Eotaxine	CCR3, DARC	
	CXCL4	PF4	?		CCL12	MCP5	CCR1, CCR2	
	CXCL5	ENA78	CXCR2		CCL13	MCP4	CCR3, CCR2, CCR1, DARC	
	CXCL6	GCP2	CXCR1, CXCR2		CCL14	CC1	CCR1	
	CXCL7	NAP2	CXCR2		CCL15	Leukotactine 1	CCR1, CCR3	
	CXCL8	IL8	CXCR1, CXCR2, DARC		CCL16	LEC	CCR1	
	CXCL9	MIG	CXCR3		CCL17	TARC	CCR4	
	CXCL10	IP10	CXCR3		CCL18	PARC	?	
	CXCL11	I-TAC	CXCR3		CCL19	MIP3 β	CCR11, CCR7	
	CXCL12	SDF1	CXCR4		CCL20	MIP3 α	CCR6	
	CXCL13	BCA1	CXCR5		CCL21	SLC	CCR11, CCR7	
	CXCL14	BRAK	?		CCL22	MDC	CCR4	
	CXCL15	Lungkine	?		CCL23	MPIF1	CCR1	
	CXCL16	CXCL16	CXCR6		CCL24	Eotaxine 2	CCR3	
CC (β)	CCL1	I309	CCR8		CCL25	TECK	CCR11, CCR9	
	CCL2	MCP1	CCR10, CCR2, DARC		CCL26	Eotaxine 3	CCR3	
	CCL3	MIP1 α	CCR5, CCR1		CCL27	CTACK	CCR10	
	CCL4	MIP1 β	CCR5		CCL28	MEC	CCR10	
	CCL5	RANTES	CCR5, CCR3, CCR1, DARC		XC (γ)	CL1	Lymphotactine α	XCR1
	CCL6	C10	?			CL2	Lymphotactine β	XCR1
	CCL7	MCP3	CCR10, CCR3, CCR2, CCR1, DARC		CX3C (δ)	CX3CL1	Fractalkine	CX3CR1
	CCL8	MCP2	CCR5, CCR3, CCR2, CCR1					

Tableau 1 : Récapitulatif des chimiokines (noms communs et noms officiels) connues de mammifères, leur famille respective et leurs récepteurs correspondants.

Les récepteurs ont été désignés CXCR1 à 6, CCR1 à 11, XCR1 et CX3CR1 selon leur capacité à lier respectivement les chimiokines de la famille des CXC, CC, C et CX3C (Mackay, 2001; Murdoch and Finn, 2000a). Étant donné le nombre de récepteurs et de leurs ligands, il apparaît que plusieurs récepteurs lient de multiples ligands permettant ainsi un certain chevauchement. Cette caractéristique permettrait une diversification des fonctions des chimiokines. Les récepteurs sont exprimés à la surface de différentes cellules, ce qui contribue à une migration sélective de celles-ci et à une certaine spécificité des tissus (Mackay, 2001). L'expression de ces récepteurs peut servir de marqueur de maturation et de différenciation pour les leucocytes. Tout d'abord, lorsque les monocytes et les cellules dendritiques immatures migrent des vaisseaux sanguins vers les tissus, elles expriment des récepteurs inflammatoires (CCR1, CCR2, CCR5, CXCR2) (Kunkel, 2002; Marquez, 2001; Murdoch and Finn, 2000a). Une fois un antigène rencontré et que le processus de maturation des cellules dendritiques a commencé, les récepteurs sont régulés à la baisse et remplacés par le CCR7 qui leur permet de s'accumuler à proximité des LT des nodules lymphatiques. À contrario, les LT matures perdent leur CCR7 afin de quitter les nodules et de se rendre au site d'infection (Marquez, 2001; Stein and Nombela-Arrieta, 2005). Un autre exemple concerne les LTh1 et les LTh2 qui expriment à leur surface différents récepteurs de chimiokines. Cette dichotomie au niveau des récepteurs permet à ces cellules une localisation différente ainsi qu'une réponse à des stimuli distincts. Le récepteur du CCL11, le CCR3, est exprimé sur les LTh2 et est régulé par l'IL4 (Annunziato et al., 1999; Sallusto et al., 1997). D'autres cellules participant aux réponses allergiques ou anti-parasitaires, comme les éosinophiles, les basophiles, les mastocytes, expriment également le CCR3. Le CCR4 et le CCR8 sont aussi préférentiellement exprimés sur les LTh2. À l'opposé, certains récepteurs, comme CCR5 et CXCR3, ont une expression plus marquée au niveau des LTh1. L'expression préférentielle de différents récepteurs de chimiokines souligne le fait que les LT ont l'habileté de cibler un territoire spécifique en réponse à des chimiokines distinctes (Mackay, 2001; Marquez, 2001; Stein and Nombela-Arrieta, 2005).

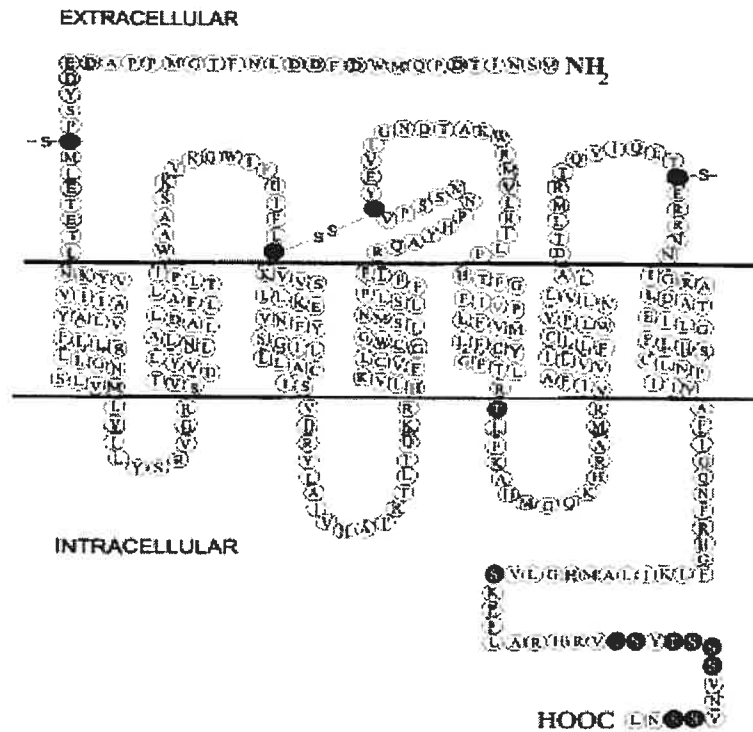


Figure 7 : Représentation schématique du récepteur de chimiokine CXCR1 (Murdoch and Finn, 2000b).

La partie N-terminale est extracellulaire et la partie C-terminale est intracellulaire.

2.1.3 Migration cellulaire

Le chimiotactisme définit le mouvement non-aléatoire mais directionnel de cellules à partir d'une faible concentration d'attracteur vers une concentration plus élevée et est une fonction commune à toutes les chimiokines (Gangur et al., 2002; Laing and Secombes, 2004). Les chimiokines produites durant une réaction inflammatoire, forment un gradient décroissant d'intensité, la plus haute concentration étant située au foyer inflammatoire. Toutes les chimiokines connues à ce jour se lient au moins à deux structures de la surface cellulaire : le côté N-terminal de la chimiokine, aux récepteurs trans-membranaires et, le côté C-terminal aux glycoaminoglycans (GAG) par un site de liaison distinct (McFadden and Kelvin, 1997). Les GAG sont des chaînes polysacchariques linéaires sulfatées se trouvant au niveau des matrices extracellulaires et à la surface de nombreuses cellules (McFadden and Kelvin, 1997). Cette liaison aux GAG de l'endothélium vasculaire et de la matrice extracellulaire facilite ainsi la présentation des chimiokines localement synthétisées sous la forme d'un gradient à leurs récepteurs pour diriger le chimiotactisme des leucocytes (Johnson et al., 2005).

2.1.4 Signalisation des récepteurs des chimiokines

Lors de sa liaison à son récepteur, la chimiokine initie un changement conformationnel qui mène à la dissociation de la protéine G associée en sous-unités α et $\beta\gamma$ (revue dans : Hamm, 1998; Stantchev and Broder, 2001) (Fig.8). Ces sous-unités activent différentes enzymes effectrices comme des phospholipases, lesquelles induisent la production d'inositol-phosphatase et l'augmentation intracellulaire de Ca^{++} , et les protéines kinases (New and Wong, 2003; Pierce et al., 2002). L'activation de cette signalisation intracellulaire aboutit à différentes fonctions telles, l'initiation du chimiotactisme, de la phagocytose, de l'expression de molécules d'adhésion. D'autres voies de signalisation sont déclenchées après l'activation du récepteur (Hermans, 2003; Murdoch and Finn, 2000a). Parmi celles-ci, il y a l'activation de NF- κ B par l'activation de la protéine kinase C médiée par la sous-unité $\text{G}\alpha$. La voie des « Mitogen-Activated-Protein-Kinases » (MAPK) est également impliquée dans la signalisation des chimiokines. Il y a trois sous-types de MAPK, les « extracellular signal-regulated kinases » (ERK) d'ordinaire associées à la prolifération et au développement cellulaire alors que les « c-Jun NH2-terminal kinases » (JNK) et la p38-MKK sont activées en réponse aux stress cellulaire (inflammation, apoptose) (Stantchev and Broder, 2001). Les ERK et la p38, mais pas les JNK, sont impliquées dans le chimiotactisme des éosinophiles par l'activation de CCR3. En effet, un des substrats de ERK est la calmoduline, une protéine qui lie l'actine qui est une protéine du cytosquelette impliquée dans la migration. Quant à la p38, elle joue un rôle dans la régulation du cytosquelette en modulant la polymérisation de l'actine (Kampen et al., 2000). Ces divers événements sont reliés à la locomotion et à la direction de la migration des éosinophiles. Il a été rapporté également que l'IL5 active les MAPK chez les éosinophiles (Pazdrak et al., 1995). Une voie alterne implique l'activation des petites GTPases telles que Rho et ROCK (Adachi et al., 2001; Shih, 2002). Ces complexes sont nécessaires pour les réarrangements du cytosquelette des cellules lors du chimiotactisme. En fait, l'éotaxine induit un influx de Ca^{++} suite à sa liaison à son récepteur CCR3. Cet apport active la kinase de la chaîne L de la myosine par le complexe « Rho-ROCK *calcium-calmodulin* » qui mène à un réarrangement de l'actine et du cytosquelette (Adachi et al., 2001).

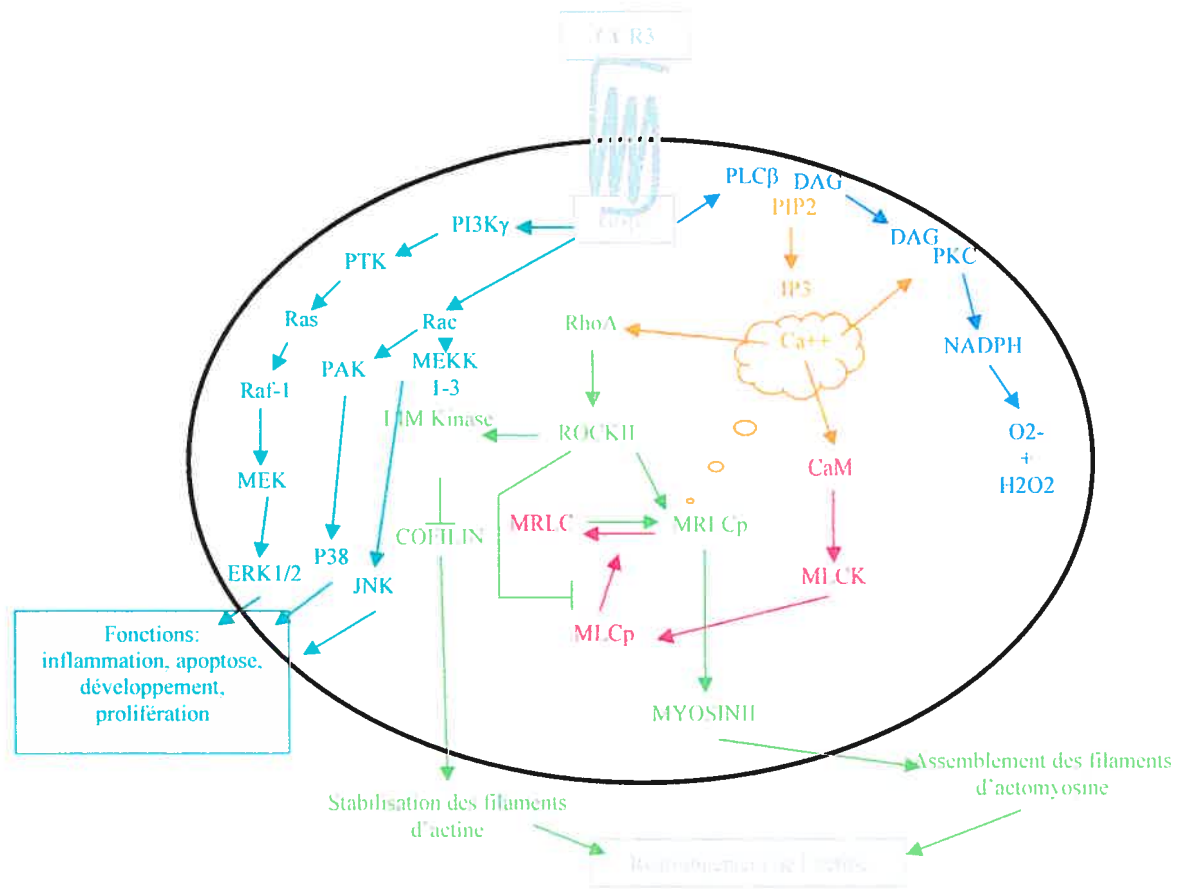


Figure 8 : Modèle d'activation de récepteurs de chimiokine CCR3 et transduction du signal au niveau de l'éosinophile.

L'éotaxine stimule la relâche du calcium intracellulaire, la production d'oxygène et le changement dans la polymérisation de l'actine. Rho est une protéine G qui active ROCK, une protéine kinase régulant la formation des fibres d'actine qui sont requises pour le chimiotactisme de l'éosinophile. La voie des MAP kinase est aussi impliquée dans le chimiotactisme.

2.2 Régulation des chimiokines par les métalloprotéinases

Plusieurs données suggèrent que les métalloprotéinases matricielles (MMP) peuvent réguler la liaison chimiokine/récepteur.

Les MMP constituent une famille de plus de 25 endopeptidases sécrétées ou membranaires, dont l'activité est dépendante du zinc, qui clivent de nombreux substrats matriciels extracellulaires (Brinckerhoff and Matrisian, 2002). Malgré une certaine spécificité de substrat, les spectres protéolytiques des différentes MMP sont assez larges et se recouvrent, ce qui permet la dégradation de l'ensemble des composants de la matrice extracellulaire et

de la membrane basale tels l'élastine, le collagène, les protéoglycans, la laminine et la fibronectine (Ohbayashi, 2002) (Tableau 2).

Désignation	Nom commun
MMP1	Collagénase 1
MMP2	Gélatinase 2
MMP3	Stromelysine 1
MMP7	Matrylisine 1
MMP8	Collagénase 2
MMP9	Gélatinase B
MMP10	Stromélysine 2
MMP11	Stromélysine 3
MMP12	Métallo-élastase
MMP13	Collagénase 3
MMP14	Métalloprotéinase de type membranaire : MT1-MMP
MMP15	Métalloprotéinase de type membranaire : MT2-MMP
MMP16	Métalloprotéinase de type membranaire : MT3-MMP
MMP17	Métalloprotéinase de type membranaire : MT4-MMP
MMP18	Collagénase 4
MMP19	RASI 1
MMP20	Enamelysine
MMP22	CMMP
MMP24	Métalloprotéinase de type membranaire : MT5-MMP
MMP25	Métalloprotéinase de type membranaire : MT6-MMP
MMP26	Matrylisine 2
MMP28	Epilyisine

Tableau 2 : Classification des MMP. Les MMP sont groupées en six classes en fonction de leur structure. Chaque MMP est dénommée par un numéro ou par un nom descriptif en rapport avec ces différentes classes.

Actuellement, des études s'orientent vers la recherche de substrats non matriciels pour les MMP dont le clivage peut avoir des effets très spécifiques dans la physiologie des cellules et des organes. Il est connu maintenant que les MMP fractionnent des molécules de surface ainsi que d'autres protéines péri-cellulaires non-matricielle (revue dans : Baker et al., 2002; Brinckerhoff and Matrisian, 2002; Egeblad and Werb, 2002; Yong et al., 2001) ce qui implique un rôle pour les MMP dans la régulation du comportement cellulaire. Les MMP influencent divers processus physiologiques et pathologiques à savoir, différents aspects du développement embryonnaire, la morphogenèse tissulaire et la réparation tissulaire. La régulation de l'activité des MMP est contrôlée par des inhibiteurs spécifiques dont l' α -2-macroglobuline, une protéine plasmatique produite par les hépatocytes ainsi que par les macrophages (Cho et al., 2004; Yong et al., 2001) et par des inhibiteurs endogènes, les « tissue inhibitors of metalloprotease » (TIMP) (Baker et al., 2002; Mautino et al., 1999). Une rupture de l'équilibre protéase-inhibiteur peut être impliquée dans la pathophysiologie de nombreuses maladies touchant divers aspects comme le cancer

(Egeblad and Werb, 2002; John and Tuszynski, 2001), l'arthrite (Burrage et al., 2006), l'asthme (revue dans : Cataldo et al., 2003; Cho et al., 2004; Kelly and Jarjour, 2003; Mautino et al., 1999; Ohbayashi, 2002).

Récemment, il a été montré que la MMP9 scindait un peptide de 6 acides aminés au niveau de la partie N-terminale de la chimiokine CXCL8, augmentant ainsi son activité chimiotactique pour les neutrophiles (McQuibban et al., 2001). Certaines MMP (MMP1, -3, -9, -13, -14) peuvent également cliver la chimiokine CXCL12. Dans ce dernier cas, il en résulte une perte de la liaison avec son récepteur qui se traduit en une perte de l'activité chimiotactique envers les cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ et les lymphocytes pré-B (McQuibban et al., 2001). Une conséquence physiologique du clivage de CXCL12 pourrait être une réduction de l'effet protecteur de cette chimiokine dans la modulation de l'infection au VIH. En effet, l'induction de l'expression de MMP par le VIH menant à une dégradation de CXCL12 pourrait constituer un facteur de virulence lié à l'augmentation de l'infection (Johnston et al., 2000). La chimiokine CCL7 est un substrat de MMP1, MMP2, MMP3 et de MMP13 (McQuibban et al., 2000; McQuibban et al., 2002). Les chimiokines apparentées que sont CCL2, CCL8 et CCL13, sont clivées par MMP1 et MMP3 (McQuibban et al., 2002). Dans ce cas, les peptides résultants se lient à leurs récepteurs respectifs mais n'induisent ni influx de calcium intracellulaire ni le chimiotactisme de lymphocytes pré-B exprimant CCR2 ou de cellules de la lignée THP-1. Ces chimiokines tronquées agissent dès lors comme des chimiokines antagonistes. Khandaker et ses collaborateurs (Khandaker et al., 1999) ont rapporté la présence d'un processus de régulation des récepteurs de chimiokines CXCR1 et CXCR2 par l'activation d'une ou de plusieurs protéinases dépendantes du zinc. La régulation à la baisse de CXCR1 et de CXCR2 par le LPS et le TNF α est significativement inhibée par des inhibiteurs de MMP. De plus, ces mêmes inhibiteurs inhibent le relargage de fragments de CXCR1 dans le surnageant de neutrophiles stimulés et rétablissent également la mobilisation de calcium intracellulaire initiée par CXCL8 (Khandaker et al., 1999).

Les substrats des MMP incluent des protéinases, des inhibiteurs de protéinases, des chimiokines, des facteurs de croissance, des récepteurs de surfaces cellulaires et des

molécules d'adhésion. Il est donc concevable que les récepteurs de chimiokines puissent être également un substrat pour les MMP avec une spécificité restant à définir. Actuellement, aucune donnée n'est encore disponible concernant la capacité des récepteurs de chimiokines ainsi dégradés à engendrer un signal d'arrêt pour la migration des cellules inflammatoires et à altérer l'infection des cellules-hôtes par divers pathogènes exploitant les récepteurs de chimiokines.

2.3 Récepteurs de chimiokines comme co-récepteurs d'agents microbiens

L'adsorption des virus sur les cellules cibles est un déterminant majeur du tropisme cellulaire des virus et de la pathogenèse virale. Cette étape précoce permet l'initiation de l'infection par fixation du virus au(x) récepteur(s) spécifique(s) et entraîne, après pénétration, la libération du génome viral dans le cytoplasme. La première étape d'une infection virale correspond à la fixation du virus sur la membrane de la cellule hôte. Cette interaction virus-cellule, si elle est spécifique, prépare l'entrée du virus dans la cellule. Il existe quelques exemples d'implication des récepteurs de chimiokines dans l'interaction entre un pathogène et sa cible, mais le modèle le plus notoire reste le VIH.

Le VIH exploite deux types de récepteurs pour l'infection des cellules : le CD4 et divers récepteurs de chimiokines dont les deux principaux sont CXCR4 et CCR5 (Peterlin and Trono, 2003; Shaheen and Collman, 2004; Stantchev and Broder, 2001). Les souches dites « R5 » utilisent le récepteur CCR5 et infectent les macrophages de façon précoce au cours de l'infection. Spécifiquement, ce récepteur est impliqué dans la transmission de personne à personne ainsi que dans la persistance et la maintenance de l'infection. Les souches R5X4 et X4 utilisent le CCR5 et/ou CXCR4 (Fig.8). Ces souches apparaissent plus tardivement dans l'infection et sont identifiées chez 30 à 50% des individus infectés. Ces variants sont fortement associés à l'accélération/progression de la maladie. L'usage d'un co-récepteur joue donc un rôle important dans les différentes étapes de l'infection du VIH (revue dans : Heveker, 2001; Shaheen and Collman, 2004; Stantchev and Broder, 2001).

Une mutation inactivante du récepteur CCR5 ($\Delta 32$ -CCR5) a été identifiée chez des individus séronégatifs, pourtant exposés de façon répétée au virus VIH-1 (Liu et al., 1996; Samson et al., 1996). La mutation $\Delta 32$ consiste en la délétion de 32 nucléotides au niveau de la région codant la seconde boucle extracellulaire du CCR5, qui entraîne un décalage de la phase de lecture introduisant un codon d'arrêt prématuré. La protéine tronquée résultante a une structure tertiaire altérée et est dégradée. Toutefois, le cas d'un individu homozygote pour l'allèle $\Delta 32$ -CCR5 et qui a développé une infection par le VIH-1 a été rapporté (Biti et al., 1997). Cette observation indique que le co-récepteur CCR5 peut vraisemblablement être substitué par un autre récepteur de chimiokines (CXCR4, CCR2B, CCR3, CCR8, CX3CR1) dans la phase précoce de l'acquisition de l'infection (Choe et al., 1998; Combadiere et al., 1998b; Doranz et al., 1996; Horuk et al., 1998).

Un autre exemple est l'implication des récepteurs de chimiokines dans la malaria. En effet, des antigènes du groupe sanguin Duffy ont une fonction réceptrice pour les mérozoïtes de *Plasmodium vivax* et de *P. knowlesi*, qui sont respectivement les agents responsables de différentes formes de malaria chez l'homme et chez le singe. Cette fonction a été mise en évidence par l'équipe de Miller en 1975 (Miller et al., 1975) en montrant la résistance des érythrocytes possédant l'antigène antithétiques Fy(a-b-), à l'invasion de mérozoïtes de *P. vivax* (Barnwell et al., 1989). À partir de 1993, les travaux d'Horuk (Horuk et al., 1993a; Horuk et al., 1993b) montraient une parfaite corrélation entre les différents phénotypes Duffy testés et la fixation ou non des chimiokines. Les érythrocytes d'individus Duffy-positif fixaient parfaitement des chimiokines contrairement à ceux issus d'individus Duffy-négatif. De plus, une expérience d'inhibition montrait que l'anticorps anti-Fy inhibait la fixation aussi bien des chimiokines α (CXCL8) que β (CCL2, CCL5) sur les érythrocytes humains (Chaudhuri et al., 1994; Hadley and Peiper, 1997; Neote et al., 1994). C'est à partir de ces observations que les antigènes Duffy furent renommés *Duffy Antigen/Receptor for Chemokines* (DARC).

2.4 Récepteurs de chimiokines comme cible de subversion virale

Il a été suggéré que le système immunitaire a acquis au cours de l'évolution et, comme résultat d'une pression permanente et de la constante lutte entre les pathogènes et leurs hôtes, une variété d'outils à sa disposition. D'un autre côté, et afin de survivre en présence d'une réponse immune active et spécifique, les pathogènes ont développé des mécanismes pour s'évader du système immunitaire de l'hôte et éviter leur élimination. Le recrutement des leucocytes de la circulation au site d'infection *via* les chimiokines est la clef de tout processus d'élimination pour des pathogènes. Pour s'en défendre, les virus ont généré des mécanismes bien distincts et élégants de leurres. Ces leurres peuvent être répertoriés en trois catégories selon leurs structures à savoir la synthèse de « faux » récepteurs de chimiokines, la synthèse de d'inhibiteurs de chimiokine et finalement, la synthèse de chimiokines virales (revue dans : Alcami, 2003; Dower, 2000; Murphy, 2001) (Fig.9).

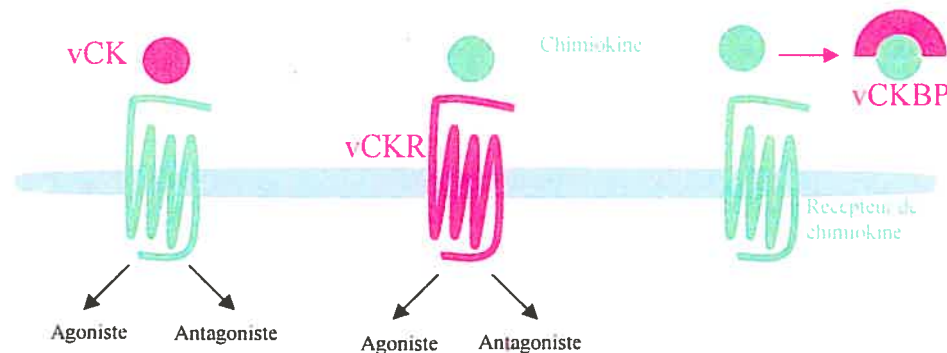


Figure 9 : Schéma des trois différentes stratégies employées par des virus pour détourner le système de chimiokines.

Les chimiokines virales encodées par les virus (vCK) peuvent fonctionner comme un agoniste et induire l'influx de cellules immunes au site d'infection pour aider le virus à sa dissémination ou comme un antagoniste pour inhiber compétitivement la liaison de la chimiokine à son récepteur. Les récepteurs de chimiokines encodés par les virus (vCKR) peuvent fonctionner comme antagoniste en liant et séquestrant les chimiokines ou comme agoniste. Les protéines virales neutralisant les chimiokines (vCKBP) peuvent bloquer la liaison des chimiokines à leur récepteur respectif.

L'exploitation du système des chimiokines durant une infection virale peut se faire à différents stades. Durant la *primo-infection*, les particules virales peuvent s'accaparer les récepteurs de chimiokines comme molécule d'adhésion. Durant *la phase aiguë*, les virus sécrètent des agonistes de chimiokines afin d'attirer des cellules cibles permettant leur replication ou sécrètent des récepteurs de chimiokines sur les cellules infectées pour faciliter leur dissémination vers un site de latence. Finalement, durant *la phase de latence*,

les cellules infectées peuvent exprimer des récepteurs pour faciliter leur persistance et leur réplication dans un site de latence ou pour rediriger la migration vers un site lytique de réactivation/réplication. Ces cellules peuvent utiliser des antagonistes de chimiokines pour se protéger des cellules du système immunitaire (Holst and Rosenkilde, 2003) (Fig.10).

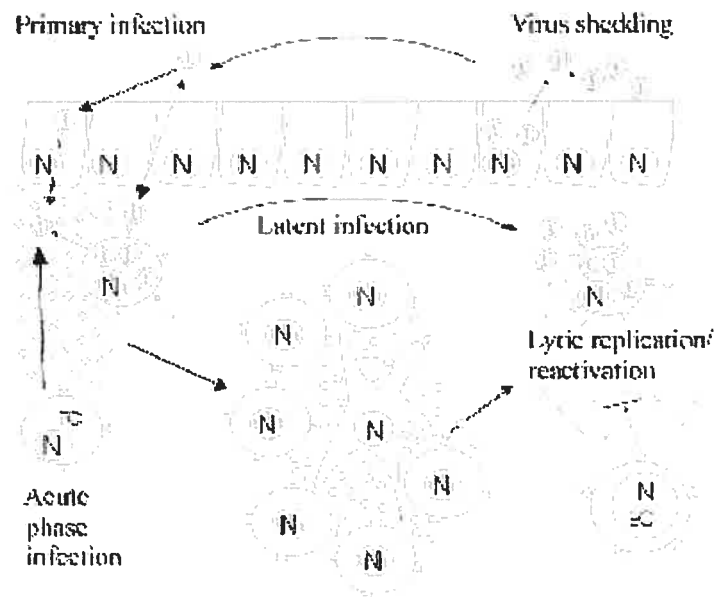


Figure 10 : Différentes étapes de l'infection virale

L'exploitation du système des chimiokines durant une infection virale peut se faire à différents stades : la primo-infection, la phase aiguë et la phase de latence. Reprinted from *Microbes Infect*, Vol 5, Holst, P.J., and M.M. Rosenkilde, *Microbiological exploitation of the chemokine system*, Pages 179-87, Copyright (2003), with permission from Elsevier.

2.4.1 Les récepteurs de chimiokines encodés par les virus (vCKR)

Les vCKR sont structurellement assez divergents et ont des propriétés fonctionnelles très différentes de celles de leurs homologues humains. En effet, beaucoup de vCKR sont constitutivement actifs et induisent la transduction de signal. L'évasion immune, l'entrée virale, la séquestration de chimiokines endogènes par endocytose et le contrôle de la migration des cellules infectées sont autant de rôles proposés pour les vCKR (Alcami, 2003; Holst et al., 2003; Rosenkilde, 2005; Rosenkilde et al., 2001). Par exemple, l'U51 de l'herpès humain-6 est un vCKR qui lie le CCL5 diminuant sa concentration sous sa forme libre dans l'environnement et ainsi inhibant le recrutement des LTh1 (Alcami, 2003). Un autre exemple est celui de l'herpès équin qui encode un récepteur CCR3 fonctionnel pour CCL11 (Gangur et al., 2002).

2.4.2 Les protéines virales neutralisant les chimiokines (vCKBP)

Ces protéines virales neutralisantes, sans séquence homologue, forment un hétérocomplexe avec la chimiokine et fonctionnent toutes comme des antagonistes du système de chimiokines endogènes (Seet and McFadden, 2002; Smith, 1996). Les vCKBP, essentiellement encodées par les poxvirus, sont divisées en trois catégories basées sur leur mode d'inhibition (Alcami, 2003). Tout d'abord les vCKBP1 qui lient les chimiokines au site d'héparine ; ensuite, les vCKBP2 qui bloquent l'interaction de la chimiokine à leur récepteur ; finalement, les vCKBP3 qui neutralisent l'effet des chimiokines en interférant à la fois au site des GAG et au niveau du récepteur.

2.4.3 Les chimiokines virales encodées par les virus (vCK) et autres protéines virales à activité chimiotactique.

Les vCK couvrent tout le spectre d'activité biologique exercée par un ligand ; c'est à dire, une activité agoniste, antagoniste ou une combinaison de celles-ci envers les différents récepteurs de chimiokines (Alcami, 2003; Murphy, 2000). Ces leurres facilitent le recrutement des cellules cibles pour l'infection virale et sélectionne celui des cellules immunes (Hamid et al., 1991; Holst et al., 2003; Holst and Rosenkilde, 2003). La protéine inflammatoire virale de macrophages (vMIP)2 de l'herpès humain-8 est antagoniste pour de nombreux récepteurs de chimiokines (CCR1, 2, 4, 5, 8, 10 CXCR4, 3, XCR1 et CX3CR1) et agit comme agoniste du CCR3 (Chen et al., 1998; Davis et al., 2004; Kledal et al., 1997; Lutichau et al., 2001; Lutichau et al., 2000). Selon divers travaux, vMIP2 bloque l'infection du VIH (Fernandez and Lolis, 2001). vMIP1 et vMIP3 agissent en agoniste pour le CCR3, CCR4 et CCR8 (Endres et al., 1999; Louahed et al., 2003; Stine et al., 2000). Les résultats des actions antagonistes et agonistes des vMIP est une polarisation immune en faveur des LTh2 en empêchant l'hôte de créer une réponse immune antivirale efficace de type Th1 (Endres et al., 1999; Lutichau et al., 2000; Sozzani et al., 1998; Stine et al., 2000).

2.4.3.1 Les protéines du VIH

La protéine extracellulaire Tat, facteur trans-activateur du VIH, est un petit polypeptide qui est relâché par les cellules infectées (Albini et al., 1998). Sa séquence d'acides aminés

correspond à des séquences essentielles des chimiokines. Elle partage les récepteurs de CCL2, de CCL7 et de CCL11 (Albini et al., 1998; de Paulis et al., 2000). Tat est un agent chimiotactique pour les monocytes et induit un rapide flux de calcium au niveau de ces cellules ainsi que des macrophages, et attire les cellules dendritiques au site d'infection facilitant ainsi l'initiation et l'établissement de l'infection. De même, Tat influence directement la migration des cellules comme les mastocytes, les basophiles et les éosinophiles (de Paulis et al., 2000) ainsi que les neutrophiles (Benelli et al., 2000). Tat interagit avec CXCR4 et inhibe l'entrée des isolats X4 du VIH. Cette observation pourrait expliquer en partie l'apparition tardive de ces souches dans la course à l'infection (Xiao et al., 2000). La sélection des souches R5, par l'action de Tat, avantagerait la dissémination du VIH au niveau de la population, et contribuerait au dysfonctionnement du système immunitaire lors de l'infection.

Toujours chez le VIH, la glycoprotéine membranaire gp120 peut également être présente sous une forme soluble (Klasse and Moore, 2004; Stantchev and Broder, 2001). Cette configuration peut influencer l'infection du VIH de diverses manières en agissant à distance à la fois sur les récepteurs des chimiokines CCR5 et CXCR4 (Murphy, 2001). Bien que similaires, la signalisation induite par la glycoprotéine ne semble pas être identique à celle causée par les chimiokines (Liu et al., 2000). En effet, malgré une certaine homologie, cette glycoprotéine et les chimiokines semblent avoir des sites d'interaction distincts avec le récepteur (Doranz et al., 1999; Lee et al., 1999). Suite à sa liaison avec les récepteurs des chimiokines, la gp120 déclenche un rapide réarrangement de l'actine du cytosquelette, sensibilise la membrane et initie le chimiotactisme de certaines cellules immunitaires (Balabanian et al., 2004). Elle peut ainsi moduler l'attraction au site d'infection, des monocytes, des cellules dendritiques, des LT de type CD4 et CD8, des LB, des mastocytes, des basophiles et des éosinophiles (Badr et al., 2005; Iyengar et al., 1999; Lin et al., 2000; Wang et al., 1998). Arrivée au site d'infection, l'expression des récepteurs des chimiokines de ces cellules est réduite par l'action de cette même glycoprotéine (Heveker, 2001; Stantchev and Broder, 2001; Weissman et al., 1997). De plus, l'interaction entre le gp120 et les IgE présents sur les mastocytes, les basophiles et les éosinophiles mène à une rapide synthèse et un relargage de médiateurs préformés et de cytokines

comme l'IL4 et l'IL13 (Patella et al., 2000). Cette interaction induit une production initiale de cytokines favorisant un glissement de phénotype Th0 en Th2. La gp120 peut également directement enclencher l'apoptose des LTCD8, des neurones, des cellules du myocarde en interagissant avec un récepteur de surface comme le CD4 et le CXCR4 qui transmet le signal létal (détruit l'homéostasie du Ca^{++} en perturbant son système de régulation) (Castedo et al., 2003; Murphy, 2001; Stantchev and Broder, 2001).

En conclusion, en mimant la fonction des chimiokines, la gp120 peut recruter ou retenir des cellules cibles proches de la source virale, induire des réarrangements du cytosquelette pour faciliter l'entrée virale, préactiver les LTCD4 quiescents afin de les rendre compétents pour la réplication virale, perturber le trafic et les réponses d'une majorité de leucocytes qui expriment les récepteurs de chimiokines CXCR4 et CCR5, et ainsi éviter la réponse immune anti-virale (Balabanian et al., 2004; Stantchev and Broder, 2001). Dans l'ensemble, les activités des glycoprotéines du VIH ont donc une implication majeure dans le recrutement, l'infection et la déplétion des cellules du système immunitaire.

2.4.3.2 Les protéines du VRS

Tout comme le VIH, le virus respiratoire syncytial humain (VRS) possède des glycoprotéines membranaires qui peuvent modifier le contexte immun lors d'une infection et contribuer à sa pathogenèse. Celles-ci exercent également leur action en exploitant les récepteurs de chimiokines. En 2001, Tripp et al. (Tripp et al., 2001) suggéreraient que la glycoprotéine membranaire G (gp90) détient une activité immunomodulatrice. Selon leurs travaux, la gp90 contient un motif CX3C, caractéristique de la chimiokine CX3CL1, qui interagit avec le récepteur de chimiokine CX3CR1. Cette similarité de séquence induirait le chimiotactisme des leucocytes et faciliterait l'infection du virus. La VRS-G peut également entrer en compétition avec CX3CL1, inhibant son effet chimiotactique sur les leucocytes. Ce site CX3C sur la gp90 prédispose selon Haynes et ses coéquipiers à l'éosinophilie (Haynes et al., 2003). En effet, des souris inoculées par une souche du VRS déléetée pour ce motif CX3C ne développent pas d'éosinophilie pulmonaire après le contact avec le virus sauvage. Le mécanisme par lequel l'interaction CX3C de la gp90 et le récepteur de chimiokine CX3CR1 contribue à l'augmentation de la maladie n'est pas encore tout à fait élucidé mais il pourrait être lié à l'induction de l'expression de la substance (S)P. Cette SP

est un médiateur inflammatoire libéré dans les voies aériennes et impliqué dans la réponse inflammatoire, la sécrétion de mucus et les broncho-spasmes (Tripp et al., 2003). Cette association modulerait la pathogenèse de la bronchiolite à VRS (Fig.11).

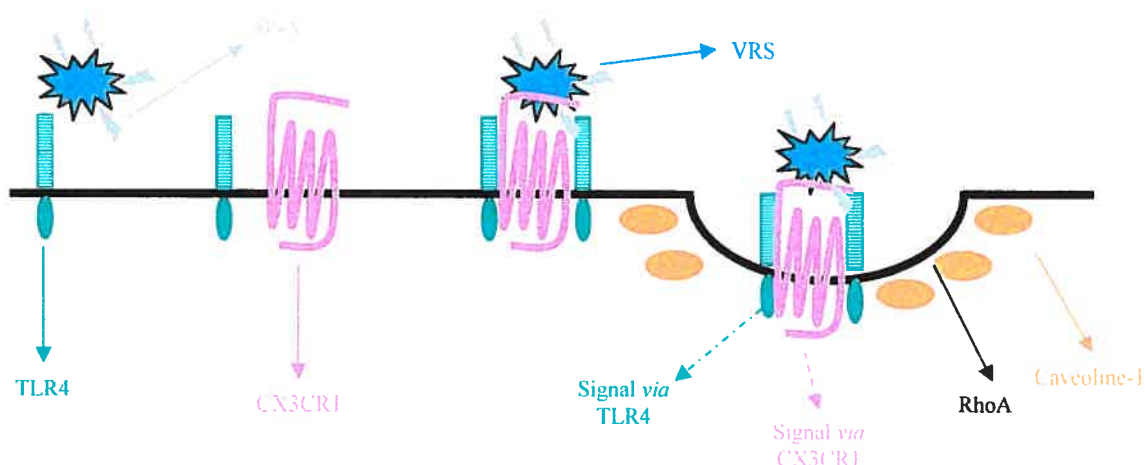


Figure 11 : Modèle hypothétique de la liaison du VRS et de sa prise en charge par CX3CR1.

Dans une première étape, le surfactant SP-A se lie au TLR4 exprimé sur les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires. Subséquemment, d'autres molécules TLR4 ainsi que le récepteur de chimiokine CX3CR1 sont recrutés au site de liaison. Dans l'étape suivante, la pF interagit avec le TLR4 alors que la gp90 se lie au CX3CR1. Ceci mène au recrutement de la cavéoline-1 et de RhoA. Les liaisons de la pF au TLR4 et de la gp90 au CX3CR1 activeraient les transductions du signal.

Un autre récepteur de chimiokines peut participer à la pathogenèse virale du VRS. Chez la souris, le récepteur CXCR2 contribue, lors de l'infection au VRS, à la production excessive de mucus au niveau du tractus respiratoire. Ainsi, l'expression du gène de la mucine (*muc5ac*), lors d'une infection au VRS, est inhibé chez des souris invalidées pour le gène CXCR2 (Miller et al., 2003). La sécrétion exagérée de mucus chez la souris suite à une infection au VRS dépendant aussi d'un récepteur de chimiokine distinct du précédent. Des souris délétées du gène CCR1 et infectées par le VRS, présentent une diminution significative de la production de mucus au niveau du tractus respiratoire ainsi qu'une réduction de la réponse inflammatoire, en particulier de la libération d'IL13 (John et al., 2005; Miller et al., 2006). Elliot et al. (Elliott et al., 2004) ont démontré qu'une chimiokine CCL5 recombinante humaine inhiberait l'infection de cellules épithéliales Hep-2 par le VRS. Un tel blocage de l'infection s'exécute via la protéine membranaire F. Ces mêmes auteurs suggèrent que cette inhibition sélective s'expliquerait par un

chevauchement entre le site de liaison de CCL5 et celui du VRS sur les cellules cibles. Finalement, un autre exemple de l'implication du système des chimiokines dans l'infection au VRS concerne le récepteur CCR5. Deux polymorphismes de CCR5 (-2459G et -2554T) ont récemment été associés à de sévères bronchiolites au VRS lors d'une étude sur des enfants anglais hospitalisés pour cette même maladie (Hull et al., 2003; Mummidi et al., 1997).

Donc, c'est récemment qu'ont été identifiés les récepteurs de chimiokines comme récepteurs viraux. Les différentes formes de la gp120 du VIH (membranaire et sécrétée) sont impliquées dans la biologie de l'infection en exploitant ces types de récepteurs. Ce mimétisme moléculaire a comme conséquence de cibler la pénétration et d'attirer des cellules spécifiques au site d'infection. À bien des égards, la gp90 du VRS est semblable à la gp120 du VIH. Les deux formes de la gp90 interagiraient avec le récepteur CX3CR1 pour moduler la réponse immune. Cet exemple ne peut exclure le fait qu'un autre récepteur de chimiokines puisse intervenir dans l'infection du VRS. Ceci expliquerait des aspects de la pathologie non encore élucidés. Par exemple, l'éosinophilie pulmonaire et l'accumulation de lymphocytes de types Th2 au site d'infection sont médiées par la conformation sécrétée de la gp90 du VRS. Or, ces cellules ne possèdent pas le récepteur CX3CR1. Actuellement rien ne permet d'infirmer que la gp90 du VRS, comme la gp120 du VIH ne puisse exploiter plusieurs récepteurs de chimiokines.

3. Objectifs

La pathogenèse de l'infection au VRS et de l'atteinte pulmonaire des souris immunisées par la protéine G (gp90) seule du VRS est semblable et postule pour un rôle critique de cette protéine dans l'initiation de la gravité de la maladie. Bien qu'il n'y ait encore aucune donnée corroborant cette hypothèse, la forme sécrétée de la gp90 pourrait jouer un rôle dans la modulation de la réponse immune. Actuellement, les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'activité de la gp90 associée à l'influx de cellules immunes (éosinophiles, lymphocytes T CD4 de type Th2), exprimant le récepteur de chimiokine CCR3, au site d'infection ne sont pas encore élucidés. Déjà, il est suggéré que, comme la gp120 du VIH, la gp90 du VRS peut exploiter le récepteur de chimiokine CX3CR1. Ceci laisse donc supposer que la gp90 du VRS a une fonction similaire à celle des chimiokines. Des études sur le rôle de la gp90 dans cette subversion de la réponse immune sont requises. En effet, pour proposer et tester une intervention thérapeutique appropriée contre le VRS, il est nécessaire de clarifier les facteurs critiques impliqués dans la physiopathologie bronchiolite à VRS ; à savoir identifier ce récepteur spécifique du virus et mieux comprendre le rôle biologique de sa gp90 sécrétée.

Notre hypothèse générale stipule que la gp90 reconnaît le récepteur de chimiokine CCR3 et agit ainsi comme une chimiokine virale : c'est-à-dire que l'infection de cellules cibles par le VRS est médiée par l'interaction entre la gp90 et CCR3 ; et que la forme sécrétée de cette protéine est impliquée dans la pathogenèse du virus en recrutant les lymphocytes T de type Th2 et les éosinophiles au site d'infection *via* ce même récepteur de chimiokine CCR3.

Afin de déterminer si le récepteur de chimiokine CCR3 est impliqué dans l'infection du VRS, les objectifs spécifiques de notre travail sont :

1) Évaluer l'expression du récepteur de chimiokines CCR3 au niveau de l'épithélium respiratoire, des éosinophiles et des lymphocytes T afin de savoir si ces cellules cibles du VRS expriment ce récepteur potentiel du VRS.

2) Tester spécifiquement la liaison de cette protéine avec le récepteur CCR3 présent au niveau de ces cellules épithéliales du tractus respiratoire en démontrant une preuve biochimique de l'association physique entre la gp90 et CCR3.

3) Comparer l'infection par le VRS de cellules transfectées ou non avec le récepteur CCR3 pour déterminer une corrélation directe entre la présence du récepteur sur les cellules épithéliales et l'infection au VRS.

4) Déterminer la capacité de la gp90 à induire le chimiotactisme sur des cellules CCR3⁺ *in vitro* et en particulier, son activité chimiotactique sur les LTh₁, Th₂ et les éosinophiles.

Sur la base de la caractérisation du récepteur, différentes stratégies sont possibles pour prévenir l'infection au VRS en agissant directement sur le récepteur CCR3. Les objectifs spécifiques suivants sont de :

5) Déterminer l'effet de l'inhibition de la pénétration cellulaire du VRS en bloquant le récepteur de chimiokine CCR3 par son ligand naturel ou par un anticorps dirigé contre le récepteur.

6) Déterminer s'il est possible d'empêcher l'attachement de la gp90 du VRS en clivant le récepteur de chimiokine CCR3 par des métalloprotéinases (MMP).

7) Explorer la possibilité de diminuer l'infection du VRS en modulant l'expression du récepteur de chimiokine CCR3 par des composés anti inflammatoires tels les glucocorticoïdes.

Il y a au moins deux raisons d'identifier les effets de la gp90 sur les cellules. Premièrement, la détermination d'un récepteur d'entrée permettrait de l'exploiter comme cible thérapeutique potentielle : l'utilisation de petits composés liant CCR3 pourrait bloquer le cycle répliatif du VRS. En second lieu la caractérisation des effets de la gp90 sécrétée est essentielle pour l'élaboration de vaccins sûrs et aurait donc une implication considérable sur la santé publique. Étant donnée l'association entre la bronchiolite à VRS et le développement subséquent de l'asthme, la prévention de l'infection au VRS pourrait avoir un impact majeur sur l'incidence et le développement de l'asthme. Ceci est d'autant pertinent que le récepteur CCR3 a un rôle primordial dans la pathogenèse de l'asthme.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Réactifs

Les anticorps (Ac) anti-récepteurs de chimiokines (CCR3, CCR5, CXCR4) proviennent de Santa-Cruz Biotechnology (San Diego, CA). Les Ac murins anti-CX3CR1 humains proviennent de Torrey Pines (Houston, TX). Pour la cytométrie en flux, les Ac anti-CCR3 conjugués au FITC et au PE furent obtenus de R&D system (Minneapolis, MN) alors que l'Ac anti-IFN- γ conjugué au FITC et l'Ac anti-IL4 conjugué au PE furent obtenus de PharMingen (San Diego, CA). Les Ac neutralisants anti-IL-4 et anti-IL12 proviennent de R&D System (Minneapolis, MN). Pour l'immunomarquage, les Ac chevalins anti-IgG de chèvres couplés ou non à la biotine furent obtenus de Vector (Burlingame, CA) et l'Ac de chèvre anti-RSV-F et couplé à la biotine provenait de Cederlane (Hornby, ON). Les Ac anti-RSV-G et anti-RSV-F furent commandés chez Chemicon International (Temecula, CA). Les cytokines recombinantes humaines (IL2, IL4, IL9, IL13), incluant les chimiokines humaines (éotaxine, MIP1 β , SDF) provenaient de R&D system (Minneapolis, MN). Les métalloprotéinases (MMP)-1, -2, -3, -7, -9, -12 et -13 furent commandés chez BIOMOL International (Plymouth Meeting, PA). Le proprionate de fluticasone (FP) provenait de Glaxo Wellcome (Montreal, QC).

2. Cellules, explants de la muqueuse nasale

Les cellules Hep2 (human laryngeal carcinoma) et A549 (human type II alveolar cell) furent obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC - Rockville, MD) et cultivées dans du milieu *Dulbecco's modified Eagle* (Gibco BRL – Grand Island, NY) supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal (FCS), de 2 mM L-glutamine et penicillium/streptomycine à 37°C dans 5 % CO₂. La lignée cellulaire ostéosarcoma (GHOST) transfectée de façon stable par différents récepteurs de chimiokines GHOST/CCR3, GHOST/CCR5 et GHOST/parental (AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIH) furent cultivées dans du *Dulbecco's modified Eagle* contenant 10 % FCS et supplémenté par 100 μ g d'hygromycine/ml, 500 μ g de G418/ml et 1 μ g de puromycine/ml, à 37°C dans 5% CO₂.

Les éosinophiles furent isolés par un protocole modifié de sélection négative selon Hansel (Hansel et al., 1990). Brièvement, le sang fut diluer (1:1) dans du tampon phosphate salin (PBS) et centrifugé sur du Ficoll Hypaque (Amersham Biosciences – Uppsala, Sweden) pour séparer les granulocytes des mononucléaires du sang périphérique. Les érythrocytes de la fraction granulocytaire furent lysés par une solution isotonique ammonium-chloride et les neutrophiles furent déléétés par un Ac anti-CD16 conjugué à des microbilles suivi d'une élution de cellules non marquées par une colonne de séparation magnétique (Miltenyi Biotec - Auburn, CA). Les lymphocytes T et les monocytes furent déplétés par l'emploi de microbilles conjuguées à des Ac anti-CD3 et anti-CD14 (Miltenyi Biotec). La population d'éosinophiles résultante atteint un degré de pureté de 95 %, tel que déterminé par la coloration avec le kit Hema 3 (Fisher Scientific – Ottawa, ON). Chaque expérimentation fut répétée avec des cellules obtenues d'un seul donneur. Cette étude fut approuvée par le comité d'éthique du Montréal Chest Institute.

Pour la génération des lymphocytes Th1 et Th2, les cellules T furent d'abord purifiées de cellules de sang de cordon par centrifugation sur du Ficoll-Paque et les cellules furent stimulées par la phytohémagglutinine (PHA) (1 µg/ml) et stimulée pour une polarisation Th1 [IL-12 humain (2 ng/ml) + Ac anti-IL-4 (200 ng/ml)] ou pour une polarisation Th2 [IL-4 (200 U/ml) + Ac anti-IL-12 (2 µg/ml)]. De l'IL-2 (40 U/ml) fut ajouté au jour 3. Après 10 jours, les cultures furent restimulées dans les mêmes conditions de polarisation et analysées après 10 jours de culture additionnels. Les cellules furent lavées et stimulées avec un Ac anti-CD3 + 10^{-7} M de phorbol 12-myristate 13-acetate. Le profil de cytokines des cellules Th1 et Th2 fut évalué utilisant à la fois un Ac anti-IFN- γ -FITC et un Ac anti-IL-4-PE par cytométrie en flux.

Pour le traitement par des MMP, les cellules furent incubées à 37°C durant 4 h avec différentes concentrations de MMPs (10, 25, 50, 100 ng/ml) dans 1ml de tampon TCN (50 mM Tris-HCl/10 mM CaCl₂/150 mM NaCl, pH 7.5). Après le traitement, les cellules furent lavées et détachées par l'addition d'EDTA (0.5M pH 7.4).

Les biopsies de la muqueuse nasale furent obtenues d'individus normaux ayant subi une amygdalectomie, adénoïdectomie ou une chirurgie du septum nasal. Le consentement fut donné par les parents avant la procédure et l'étude fut approuvée par le comité d'Éthique de l'Université McGill Health Center. Immédiatement après la collection, les biopsies furent

placées dans un tampon bicarbonate et transportées dans de la glace pour leur mise en culture éventuelle. Les différentes sections furent placées sur un filtre (pores de 0,4- μm) de 30-mm de diamètre et insérées dans un puits (Millipore Corp – Bedford, MA) contenant 2 mL de *Dulbecco's modified Eagle* complet.

3. Virus, purification de la forme sécrétée de la glycoprotéine G du VRS (gp90) et infection

Les souches A2 (ATCC VR-1401) et B (ATCC VR-955) du VRS furent utilisées. La glycoprotéine G (gp90) du VRS a été purifiée selon la méthode décrite suivante (Johnson et al., 1998). Brièvement, des cellules Hep2 furent infectées par du VRS à une MOI (multiplicity of infection) de 1. À 24 h post-infection, le milieu de culture cellulaire fut clarifié par centrifugation et transféré sur 1.46 M sucrose-1 mM NaH_2PO_4 (pH 7.2) pour séparer les virions intacts de la protéine sécrétée et centrifugée 90 min à 62000 x g. Le surnageant fut récupéré et dialysé toute la nuit à 4°C contre 20 mM Tris-HCl 0.5 M NaCl (pH 7.4) et fut ensuite appliqué sur une colonne de Concanavalin A-Sepharose-lectin (Pharmacia Biotech – Uppsala, Sweden). Les protéines liées furent éluées par l'application de 0.5 M methyl- α -mannopyranoside dans 20 mM Tris-HCl-0.5 M NaCl (pH 7.4). La fraction élue fut ensuite passée sur une colonne d'affinité de cyanogène bromide-activated sepharose 4B contenant des Ac anti-VRS-G. La gp90 du VRS fut récupéré de la colonne par l'élution avec 0.1 M glycine buffer. La protéine purifiée fut stockée à -20°C.

L'infectivité au VRS fut déterminée par la détermination du nombre de plaque de lyse ou par immunomarquage. Pour la détermination de plaque de lyse, des dilutions sériées du VRS furent appliquées sur une monocouche de cellules à 37°C. Après 1 h d'adsorption, les cellules furent lavées trois fois avec du PBS et recouvertes de milieu contenant 10% FCS et 0,75% méthylcellulose. Sept jours post-infection, les cellules furent fixées et marquées avec le kit Hema 3 (Fisher Scientific – Ottawa, ON). Les plaques de lyses furent comptées et l'infectivité du virus déterminée. Pour l'immunomarquage, les cellules furent infectées avec un volume égal de VRS (10^3 PFU/ml) pour 1 h. Après cette période, les cellules furent lavées 3 fois avec du PBS et recouvertes avec du milieu complet correspondant. 24 h post-infection, les cellules furent fixées et incubées avec un Ac anti-VRS-F-marqué à la biotine

toute la nuit à 4°C. Les cellules positives (infectées) furent marquées en rouge après le développement par le substrat *Fast Red alkaline phosphatase*. Dans certaines expérimentations, l'effet de l'éotaxine, de MIP1 β , de SDF, de l'Ac anti-CCR3, de l'Ac anti-CCR5 et de l'Ac anti-CXCR4 sur la formation de plaque de lyse fut déterminé. Différentes concentrations de protéines recombinantes (2, 0.1, 0.01 $\mu\text{g/ml}$) ou d'Ac (5 $\mu\text{g/ml}$) furent ajoutées au milieu de culture cellulaire durant 1 h avant l'infection au VRS. Pour l'immunomarquage, les cellules Th1, Th2 et les éosinophiles furent incubées avec de l'éotaxine (5 $\mu\text{g/ml}$) ou un Ac anti-CCR3 (5 $\mu\text{g/ml}$) pour 1 h avant l'infection au VRS. Les résultats sont présentés en pourcentage d'inhibition de l'infectivité du virus des cellules traitées comparées aux cellules contrôles non-traitées.

Le FP fut dilué dans le milieu de culture et utilisé à une concentration finale de 10^{-5} à 10^{-7} M. Les cellules Hep2 furent pré-traitées avec du FP pour 12, 24, 36 ou 48 h avant une infection au VRS. Les explants nasaux furent pré-traités durant 24 h avec du FP à une concentration de 10^{-7} M avant l'infection au VRS.

4. Immunomarquage

Les biopsies nasales de donneurs furent fixées avec du méthanol/acétone à -20°C durant 10 min. Après le blocage avec une solution *Dako blocage* pour 30 min, les lames furent incubées avec un Ac anti-CCR3 (5 $\mu\text{g/ml}$) toute la nuit à 4°C. Les sections furent alors incubées 1 h à 37°C avec 5 $\mu\text{g/ml}$ d'un Ac chevalin anti-IgG de chèvre marqué à la biotine. Les lames furent lavées intensément avec du TBS et incubées avec un complexe de streptavidine-alkaline phosphatase durant 30 min à température ambiante. La réaction fut visualisée avec un substrat de *Fast Red alkaline phosphatase* (Sigma Chemical Co. - St. Louis, MO). Les noyaux des cellules et le cytoplasme furent marqués avec le kit Hema 3. Comme contrôle, la même technique fut utilisée en l'absence d'Ac primaire.

5. Cytométrie en flux

L'expression cellulaire de CCR3 sur les cellules A549, GHOST/CCR3 et GHOST/parental fut évaluée en utilisant une méthode standard de cytométrie en flux. Les cellules furent

lavées avec du PBS, détachées avec du PBS-EDTA et incubées durant 20 min avec du PBS contenant 5 % FCS et 10 µg/ml d'immunoglobulines humaines afin de bloquer les récepteurs Fc. Les cellules furent ensuite resuspendues à une concentration de 4×10^6 cellules/ml dans 25-µl et furent marquées avec un Ac anti-CCR3-FITC ou avec un isotype contrôle à 4°C pour 1 h. Après un lavage, les cellules furent resuspendues dans du PBS et analysées.

La liaison de l'éotaxine et de MIP1β à leurs récepteurs respectifs fut déterminée en présence ou absence de la protéine G ou F du VRS (10 ng/ml) par cytométrie en flux (R&D Systems - Minneapolis, MN). Les cellules furent resuspendues à une concentration de 4×10^6 cellules/ml dans 25-µl et incubées avec 10 µl de chimiokines biotinylées (éotaxine, MIP-1β) pour 60 min sur la glace. Après cette incubation, 10 µl de streptavidine-FITC furent ajoutées et les cellules furent incubées pour un autre 30 min à 4°C à l'abri de la lumière. Les cellules furent alors lavées 2 fois avec du tampon fourni afin d'ôter le surplus d'avidine-FITC, resuspendues dans 200 µl de PBS et analysées par cytométrie en flux. Comme contrôle négatif, un échantillon identique de cellules fut incubé avec 10 µl de réactif non biotinylé (fourni par le kit, R&D system - Minneapolis, MN). La spécificité de la réaction fut évaluée en mélangeant 20 µl d'Ac anti-éotaxine humaine avec 10 µl d'éotaxine biotinylés et incubé 15 min à température ambiante.

Pour analyser l'effet des MMP sur l'interaction entre les chimiokines et leur récepteurs, les GHOST/CCR3 et GHOST/CCR5 traitées et non traitées furent respectivement détectées en utilisant de l'éotaxine ou du MIP1β conjugués à la biotine (R&D Systems - Minneapolis, MN) selon les instructions de la compagnie.

Pour l'analyse, les effets des MMP sur l'expression de CCR3 des éosinophiles fut évaluée par cytométrie en flux. Cent microlitres (10^5 cell/ml) d'éosinophiles furent distribués dans des plaques 96-puits et centrifugés. Ensuite, les cellules ont été resuspendues dans 50 µl d'Ac anti-CCR3-PE ou anti-CCR3-FITC ($2 \mu\text{g}/10^6$) (R&D system - Minneapolis, MN) ou de leurs contrôles isotypiques ($2 \mu\text{g}/10^6$) à 4°C pour 60 min.

L'acquisition et l'analyse des échantillons ont été réalisées à partir de 10000 événements sur un FACScan (Becton Dickinson – Mississauga, ON).

6. Mesure de l'expression de l'ARNmessenger par la rt-PCR

L'expression de l'ARNm de CCR3 de différents types cellulaires fut déterminée par rt-PCR. L'ARN total fut isolé par Trizol (Invitrogen – Burlington, ON). La transcription reverse fut réalisée en utilisant 1 µg d'ARN total pour la synthèse du premier brin d'ADNc avec la transcriptase reverse du virus de murin moloney de la leucémie (Life Technologies - Gaithersburg, MD). La β -2-globuline (amorce sens 5'-TGC TGA CGC TTG ATG AGA-3' et amorce anti-sens 5'-CGC AGA GAG AAG TCG ATG TG-3') fut utilisé comme standard de contrôle pour la variation de l'isolation de l'ARN, la synthèse de l'ADNc et la performance de la PCR. Les échantillons furent amplifiés (30 cycles) à 94°C pour 1 min, 60°C pour 2 min et 72°C pour 3 min. Un fragment de -bp a été généré utilisant l'amorce sens 5'-TCC TTC TCT CTT CCT ATC AAT C-3' et antisense 5'-GGC AAT TTT CTG CAT CTG-3' spécifique pour le CCR3 humain. Les bandes d'intensité furent obtenues par marquage à l'éthidium bromide sur un gel d'agarose.

7. Immunoprécipitation et Western blot

Les cellules A549 et GHOST/CCR3 ont été infectées par le VRS (10^3 PFU/ml) durant 3 jours. Les cellules ont été lavées et lysées (50×10^6 cells/ml) par du buffer RIPA dans du PBS (0,5 Triton X-100, 150 mM NaCl, 200 mM Boric acid (pH 8), 5mM EDTA, 5mM sodium fluoride et 1 mM sodium vanadate). Les lysats ont été centrifugés durant 30 min à 14.000 RPM pour retirer les noyaux. Ensuite, les surnageants furent incubés toute la nuit avec l'Ac primaire et les complexes immuns furent collectés sur des billes de A/G-sepharose (Research Diagnostics, Inc – Concord, MA) durant 2 h à température ambiante. Les précipités furent lavés avec du PBS et un Western blot fut utilisé par une méthode standard en accord avec le protocole fourni avec le kit de détection de chémiluminescence (Roche – Laval, QC). Les complexes formés par la protéine du VRS et de CCR3 immunoprécipitaient avec un Ac anti-gp90 du VRS ou anti-CCR3. Pour la détection par le Western blot, les Ac anti-CCR3 ou anti-gp90 du VRS furent respectivement utilisés comme Ac primaire. Comme contrôle positif, les cellules GHOST/CCR3 furent précipitées avec un

Ac anti-CCR3 et révélées avec un Ac anti-CCR3. Un Ac isotypique a été inclus comme contrôle négatif de cette expérience.

Les cellules traitées par des MMP furent détachées et subirent le même protocole que ci haut mais ensuite, 30 µg de protéines / échantillon furent passés sur un gel de tris-tricine à 13 % et transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes furent exposées toute la nuit à 4°C à l'Ac anti-CCR3 (5 µg/ml). Après un lavage dans du TBS, le second Ac marqué à la peroxydase fut appliqué à une dilution 1:10.000 pour 1 h à température ambiante. La liaison du second Ac fut détectée par un kit de détection utilisant le CSPD (Life Technologies - Gaithersburg, MD). Le signal fut visualisé sur un film Kodak Bio-Max.

8. Chimiotactisme

La migration des GHOST/CCR3, des éosinophiles, des cellules Th1 ou Th2 en réponse à l'éotaxine (100 ng/ml), MIP1β (100 ng/ml) ou la RSV-G (50 ng/ml) et traitées ou non par les MMP furent évaluées dans des chambres (24 puits) de Boyden (NeuroProbe - Gaithersburg, MD) en utilisant des filtres de polycarbonate (5-µm pore size). Brièvement, les cellules furent resuspendues à 10⁶ cellules/ml dans du RPMI plus 0.1% BSA, déposées dans les puits supérieurs et testées pour leur migration en réponse au milieu avec 0.1% BSA (contrôle négatif) ou une augmentation croissante de la concentration d'éotaxine, de MIP1β ou de RSV-G. Dans certaines expériences, les cellules furent incubées 1 h avec un Ac anti-CCR3 ou anti-CCR5 (10 µg/ml) avant de les déposer dans la chambre supérieure. Les chambres furent incubées à 37°C dans 5% CO₂ durant 2 h. Les cellules localisées sur la surface supérieure du filtre furent grattées et les cellules ayant migrées à la surface inférieure de la membrane furent colorées avec le kit Hema 3. Le nombre de cellules ayant migré à la surface inférieure du filtre fut compté en utilisant un microscope conventionnel. Les données sont exprimées en pourcentage des cellules ayant migré par rapport aux cellules appliquées. Pour les cellules traitées par les MMP, le résultat est exprimé en pourcentage de migration induite par l'éotaxine comparées à la migration des cellules en réponse au milieu seul.

9. Détermination de la production de mucus chez les cellules A549

Les cellules A-549 ont été cultivées dans des chambres de 8-puits et ont été traitées avec de l'éotaxine (50 ng/ml) ou du RSV-G (20 ng/ml) dans le milieu de culture durant 24 h en présence ou absence d'Ac anti-CCR3 (10 µg/ml). Les cellules furent alors fixées avec de la formaline et les glycoconjugués du mucus furent visualisés par marquage au « Alcian blue / periodic acid Schiff's » (AB/PAS) (grossissement : x 200). IL-9 humaine (200 U/ml) et l'IL-13 humaine (200 U/ml) recombinantes furent employés comme des contrôles.

10. Analyses Statistiques

Les différences entre les groupes furent déterminées par analyse de variance (ANOVA) ou par le « *Student t test* » lorsqu'approprié. Une valeur de $p < 0.05$ fut considérée comme statistiquement différente.

RÉSULTATS

1. L'interaction entre le VRS et CCR3

RÉGULATION DE L'INFECTION DU VRS EN BLOQUANT SON RÉCEPTEUR CELLULAIRE PAR LE LIGAND NATUREL

L'hypothèse générale stipule que la glycoprotéine G (gp90) du VRS agit comme une « chemokine like protein » et qu'elle initie l'infection du VRS par son interaction avec les récepteurs de chimiokines.

Dans ce travail, nous avons démontré que le récepteur de l'éotaxine (CCR3) est impliqué dans l'infection des cellules épithéliales respiratoires par le VRS. Une inhibition de l'infection des cellules épithéliales a été obtenue avec des anticorps anti-CCR3 ou de l'éotaxine recombinante. Par contre les chimiokines MIP1 β et SDF ou des anticorps dirigés contre leurs récepteurs respectifs n'ont eu aucun effet sur l'infection. Grâce à des expériences de cytométrie en flux, nous avons démontré que, contrairement à la protéine F, la gp90 inhibe la fixation de l'éotaxine sur le CCR3, alors qu'elle n'a aucun effet sur celle de MIP1 β sur CCR5. La formation du complexe protéique entre la gp90 et le CCR3 a été démontrée par des expériences d'immunoprécipitation (anticorps anti-CCR3) suivie d'un immunobuvardage (anticorps anti-gp90). En plus, la gp90 induit la migration des éosinophiles et des cellules Th2 *in vitro* alors qu'elle n'a qu'une faible activité chimiotactique sur les cellules Th1. Cette activité chimiotactique est inhibée lorsque le récepteur CCR3 est bloqué par un anticorps anti-CCR3. **Globalement, ces résultats démontrent que CCR3 est impliqué dans l'interaction du VRS et les cellules cibles via sa glycoprotéine G (gp90).**

1.1 La glycoprotéine G du VRS inhibe la liaison de l'éotaxine aux cellules A549 et GHOST/CCR3

L'interaction entre le VRS et le récepteur de chimiokine CCR3 fut explorée dans différents types cellulaires telles les A549, les Hep2, les cellules GHOST/CCR3 et les éosinophiles. Dès lors, des expériences initiales furent conduites afin de vérifier si ces différents types cellulaires expriment CCR3 par la technique de rt-PCR et de cytométrie en flux. Les lignées cellulaires A549, Hep2 et les éosinophiles expriment un niveau détectable d'ARNm de CCR3 (figure 12A). Comme convenu, les cellules GHOST/CCR3 expriment également le transcrite CCR3. La technique de cytométrie en flux a mis en évidence une expression à la surface cellulaire significative de CCR3 sur les cellules épithéliales A549 (figure 12B). L'expression de CCR3 est également identifiée au niveau des cellules de l'épithélium de la muqueuse nasale après la technique d'immunomarquage, confirmant ainsi l'expression de CCR3 sur les cellules épithéliales humaines du tractus respiratoire (figure 12C).

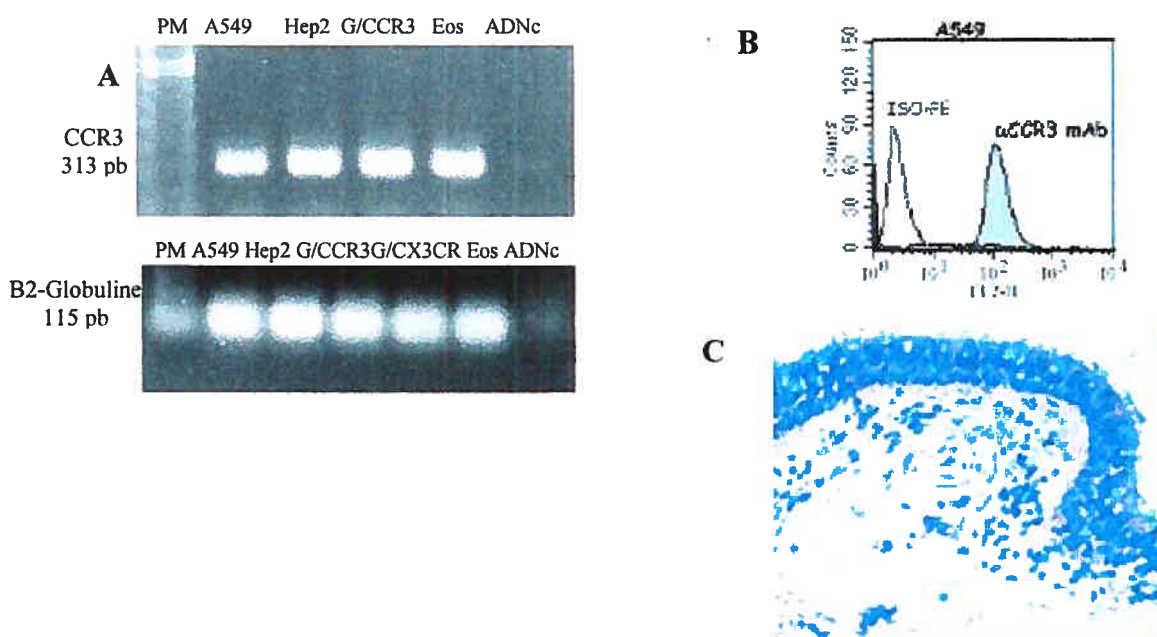


Figure 12 : L'ARNm et la protéine du CCR3 sont exprimées dans différents types de cellules épithéliales et dans les éosinophiles.

A : L'ARN purifié des cellules épithéliales (A549 & Hep2) et des éosinophiles fut examiné pour la présence du transcrite CCR3 *via* rt-PCR. Pour les contrôles positifs, l'ARN des cellules GHOST/CCR3 a été utilisé (G/CCR3). Les cellules épithéliales et les éosinophiles expriment de l'ARNm CCR3. Les fragments d'ADNc

amplifiés ont la longueur attendue de 313 pb pour CCR3 et de 115 pb pour la β -2-globuline. B : Expression à la surface cellulaire de CCR3 sur les cellules épithéliales humaines. Les cellules A549 furent analysées par cytométrie en flux avec un Ac anti-CCR3 humain ou un Ac contrôle isotypique (iso-PE). C : Immunomarquage de CCR3 sur des biopsies de muqueuse nasale. Les cellules CCR3 positives apparaissent en rouge.

Après avoir confirmé l'expression de CCR3 dans nos différentes lignées cellulaires expérimentales, nous avons ensuite investigué si la gp90 du VRS peut physiquement interagir avec CCR3. Notre première stratégie fut d'investiguer si la gp90 pouvait entrer en compétition avec la liaison entre CCR3 et l'éotaxine, son ligand naturel. Nos résultats démontrent la liaison entre l'éotaxine sur les cellules A549 (figure 13A) et GHOST/CCR3 (figure 13B) laquelle est inhibée par un Ac anti-éotaxine. L'addition de la gp90 réduit la liaison de l'éotaxine (figure 13C et D) alors que la VRS-F n'a pas d'effet. À la fois la gp90 et la VRS-F n'ont pas d'effet sur la liaison de MIP1 β sur les A549 (figure 13E) et les GHOST/CCR5 (figure 13F). Ces données suggèrent que la gp90 du VRS lie spécifiquement le CCR3. Nous avons ensuite étudié l'association physique entre CCR3 et la gp90 du VRS par des techniques combinées d'immunoprécipitation et de Western blot. Les Western blots ont tout d'abord révélé que la taille de la protéine sécrétée gp90 est de 90kD (figure 14A). Afin de caractériser l'association entre CCR3 et la gp90, nous avons examiné si les deux protéines peuvent co-immunoprecipiter avec un Ac anti-VRS-G ou anti-CCR3. Les lysats de cellules infectées par le VRS immunoprécipitent avec un Ac anti-RSV-G et montrent un poids moléculaire comparable à la protéine CCR3 après sa révélation suite à un Ac anti-CCR3 (figure 14B). De même, l'immunoprécipitation avec un Ac anti-CCR3 résulte en la co-immunoprécipitation de la protéine de surface qui fut estimée à 90 kD (figure 14C). Collectivement, ces données démontrent que CCR3 s'associe avec la gp90 du VRS, confirmant, *in vitro*, l'interaction physique entre ces deux protéines.

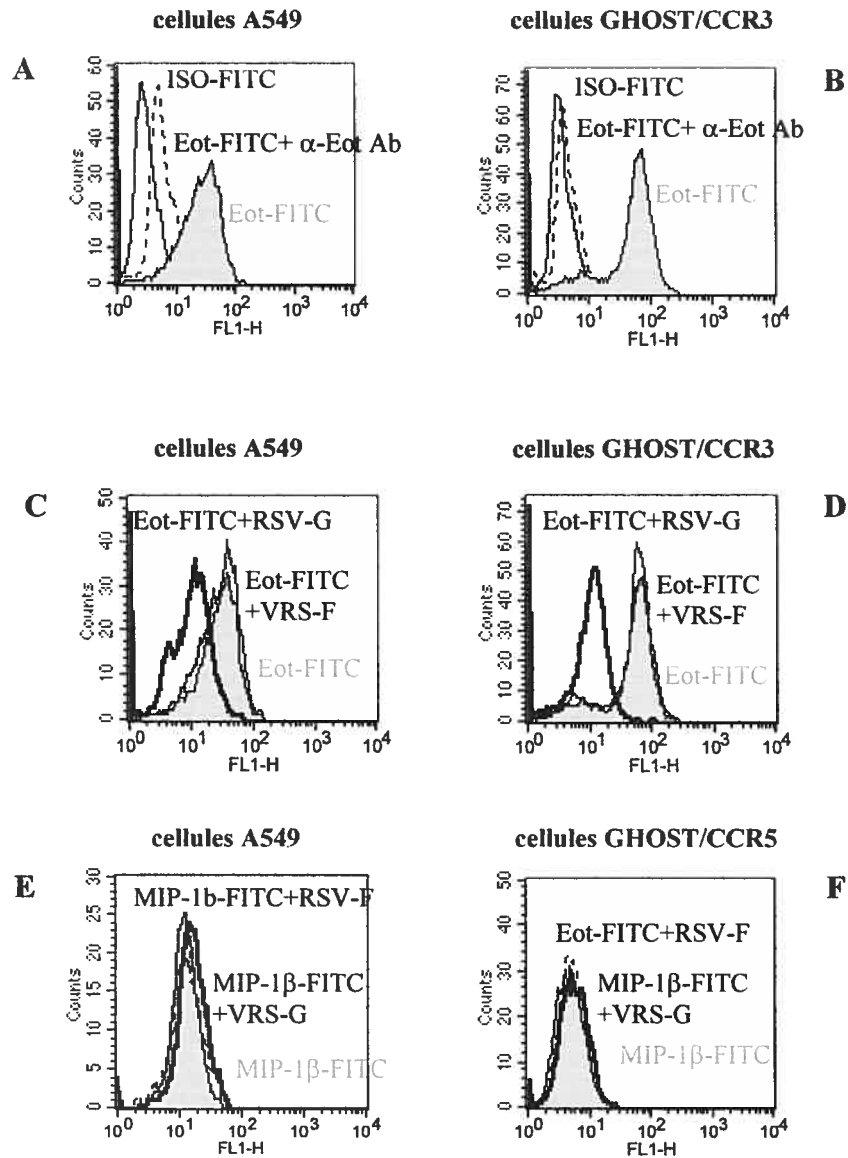


Figure 13 : La glycoprotéine G du VRS inhibe la liaison de l'éotaxine aux cellules A549 et aux cellules GHOST/CCR3.

La liaison de l'éotaxine ou de MIP1 β aux cellules A549, GHOST/CCR3 ou CCR5 en présence ou absence de VRS-G ou VRS-F fut déterminée par cytométrie en flux en utilisant de l'éotaxine ou du MIP1 β biotinylés suivi d'avidine conjuguée au FITC. Les histogrammes pour la liaison de l'éotaxine aux cellules A549 (A) et GHOST/CCR3 (B) en présence ou absence de VRS-G sont montrés. La liaison de l'éotaxine aux cellules A549 (C) et GHOST/CCR3 (D) est inhibée en présence de VRS-G mais pas en présence de VRS-F. Les protéines VRS-G et VRS-F n'ont pas d'effet sur la liaison de MIP1 β aux cellules A549 (E) et GHOST/CCR5 (F).

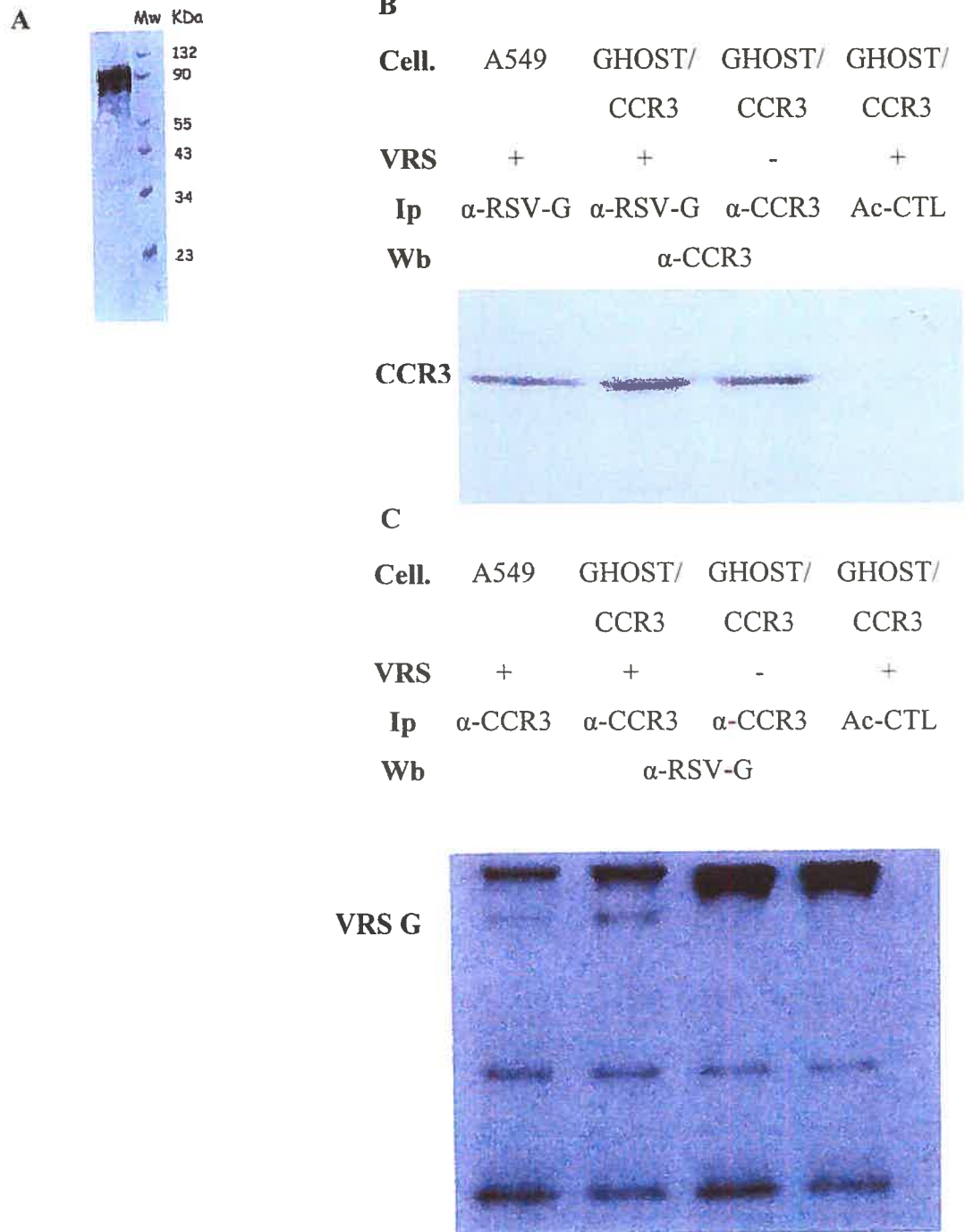


Figure 14 : CCR3 s'associe à la protéine G du VRS.

A : Immunoblot de la fraction collectée après la purification et marquée avec un Ac anti-VRS-G. Le poids moléculaire de la protéine G du VRS purifiée fut estimé à 90 kDa. B et C : Interaction physique entre la VRS-

G et le CCR3. Les cellules A549 et GHOST/CCR3 infectées par le VRS furent lysées et le complexe formé entre la protéine G du VRS et CCR3 fut immunoprécipité avec un AC anti-VRS-G (B) ou anti-CCR3 (C), précipité et analysé par SDS-PAGE suivi d'une analyse au Western blot utilisant respectivement un Ac anti-CCR3 ou anti-VRS-G. Des isotypes contrôles IgG furent inclus dans cette expérimentation. Cette expérience représente 3 expérimentations indépendantes.

1.2 L'infection du VRS est inhibée en bloquant le récepteur CCR3

Après avoir déterminé que CCR3 interagit avec la gp90 du VRS, nous avons évalué la contribution de CCR3 dans l'infection du VRS. À la fois les cellules épithéliales Hep2 et les GHOST/CCR3 supportent la réplication du VRS et produisent du virus 24 heures après l'infection (figure 15A-C). L'infection au VRS est partiellement inhibée lorsque l'éotaxine est ajoutée au milieu de culture avant l'infection (figure 15D). De plus, l'infection au VRS est également inhibée lorsque les cellules furent pré-incubées avec un Ac anti-CCR3 (figure 15E). Ces données montrent que le fait de bloquer le récepteur CCR3 par soit le ligand, soit par l'Ac anti-CCR3 réduisent la capacité du VRS d'infecter les cellules cibles. L'infectivité des cellules GHOST/parental (CCR3 négative) par le VRS est moins prononcée que pour les cellules GHOST/CCR3 (figure 4F), en accord avec l'implication de CCR3 dans l'infectivité du VRS. La contribution de CCR3 dans l'infection du VRS fut investiguée chez les cellules Hep2 par l'analyse de la formation de plaques de lyse. Dans ces expériences, les cellules Hep2 furent pré-incubées avec différentes concentrations d'éotaxine (2 ; 0,1 et 0,01 $\mu\text{g/ml}$) ou d'Ac anti-CCR3 (5 $\mu\text{g/ml}$). L'éotaxine inhibe la formation de plaques de lyse de façon dose-dépendante (tableau 1). La pré-incubation avec l'Ac anti-CCR3 induit une inhibition de près de 90% de la formation de plaques de lyses. Au contraire, le pré traitement avec différentes dilutions d'Ac anti-MIP1 β , SDF, CCR5 ou CXCR4 n'induit que des effets minimes ou nuls sur la formation de plaque d'infection. Ces résultats suggèrent qu'en plus d'interagir avec la gp90 du VRS, CCR3 contribue également à diminuer l'infection du VRS.

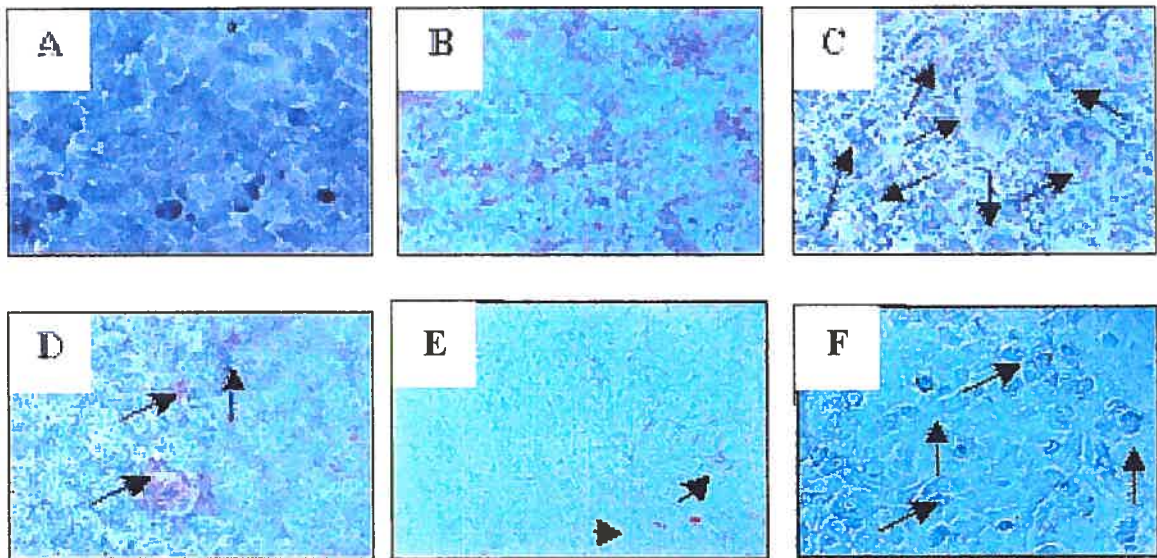


Figure 15 : Infection du VRS chez les cellules exprimant CCR3 et inhibition par l'éotaxine et un Ac anti-CCR3.

Les cellules Hep2 cultivées en micro-puits furent non infectées (A) ou infectées (B) par le VRS et marquées avec un Ac anti-VRS-F biotinyllé. Les cellules GHOST/CCR3 furent infectées en l'absence (C) ou la présence d'éotaxine (D) ou en présence d'un Ac anti-CCR3 (E). Les cellules GHOST/parental furent également infectées (F) par le VRS. L'infection au VRS fut évaluée par immunomarquage en utilisant un Ac anti-RSV-F comme décrit dans la partie « Matériels et Méthodes ». Les flèches indiquent la présence d'effets cytopathiques caractéristiques du VRS. Cette expérience représente 3 expérimentations indépendantes.

Traitement	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibition (%)
Éotaxine	2	88
Éotaxine	0,1	45
Éotaxine	0,01	25
Mip1 β	2	15
Mip1 β	0,1	0
Mip1 β	0,01	0
SDF	2	9
SDF	0,1	0
SDF	0,01	0
Anti-CCR3	5	89
Anti-CCR5	5	8
Anti-CXCR4	5	11
Lapin IgG	5	4
Souris IgG	5	5

Tableau 3 : Inhibition de l'infection au VRS par l'éotaxine et un Ac anti-CCR3.

La préincubation avec l'éotaxine utilisée à différentes concentrations ou un Ac anti-CCR3 inhibe l'infection du VRS chez les cellules Hep2, mesurée par la formation de plaques infectieuses.

1.3 Le VRS infecte les éosinophiles et les cellules Th2

En plus des cellules épithéliales, CCR3 est également exprimé par d'autres cellules tel que les éosinophiles et les cellules Th2. Afin d'étudier l'interaction entre le VRS et CCR3 dans ces types cellulaires, nous avons généré des cellules Th1 et Th2 en stimulant, respectivement, des lymphocytes de sang de cordon avec des mitogènes en présence d'IL12 et d'Ac anti-IL4 ou d'IL4 et d'Ac anti-IL12. La figure 16A montre le profil de cytokines de ces deux types cellulaires. Les cellules Th1 induites expriment un haut niveau d'IFN γ mais peu d'IL4, alors que les cellules du sang de cordon stimulées en présence d'IL4 et d'Ac anti-IL12 engendrent en une population de cellules exprimant principalement de l'IL4. Suite à l'infection au VRS, le pourcentage de cellules infectées par le VRS est plus élevé

dans les cellules Th2 (82 %) que dans les Th1 (23 %) (figure 16B). De plus, le pourcentage d'infectivité est également élevé chez les éosinophiles. La pré-incubation avec un Ac anti-CCR3 inhibe de façon significative l'infection au VRS à la fois chez les éosinophiles et chez les cellules Th2 mais a un effet minimum chez les cellules Th1. Ces données suggèrent que CCR3 contribue à l'infection du VRS des éosinophiles et les cellules Th2 mais pas les cellules Th1.

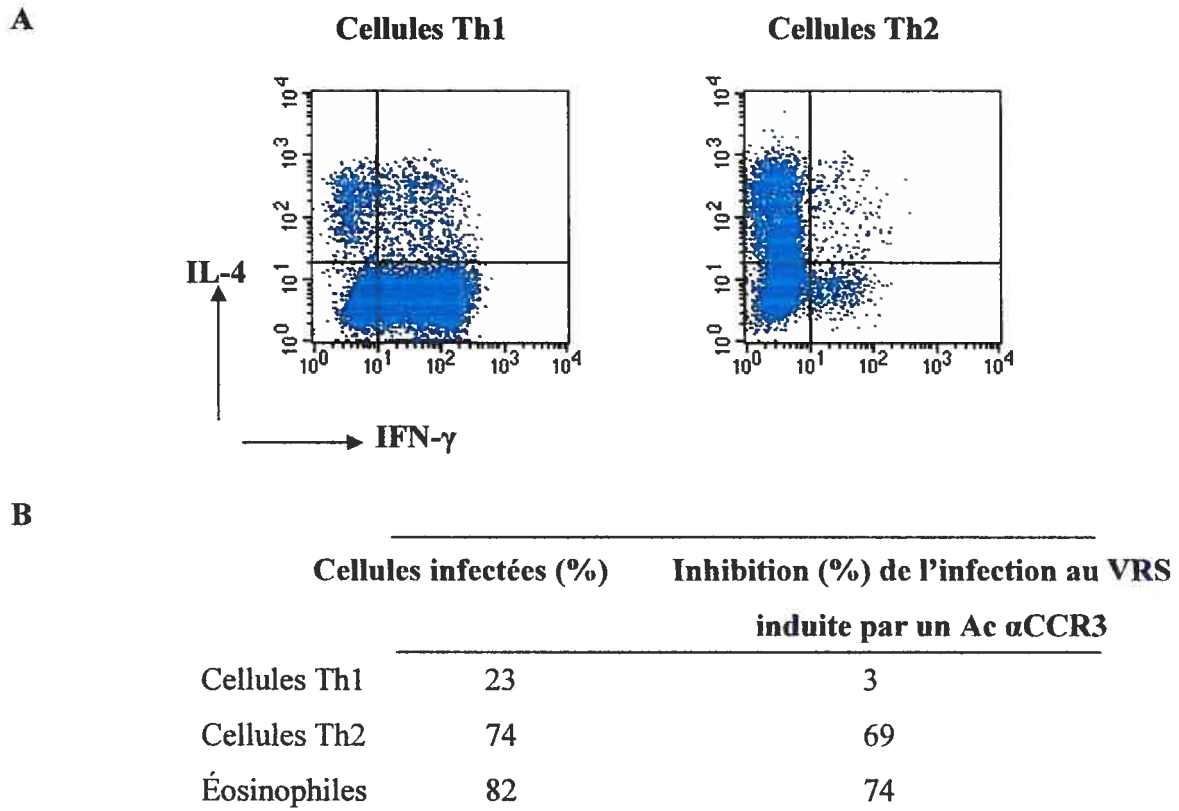
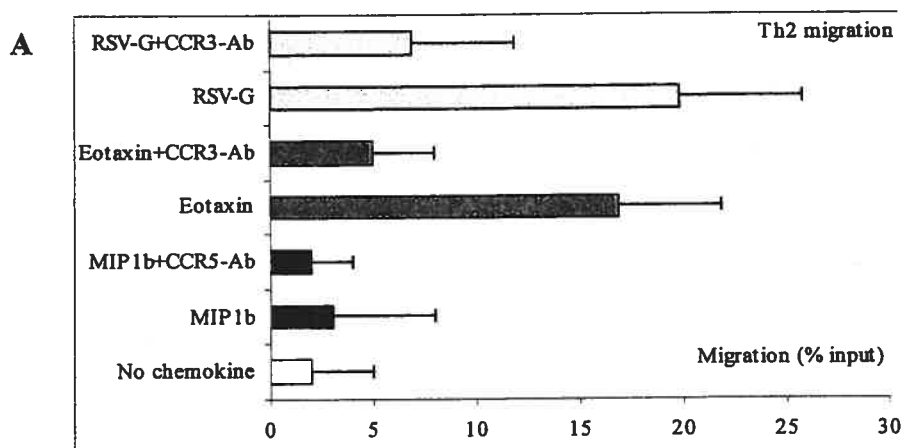


Figure 16 : Infection des cellules Th1, Th2 et des éosinophiles par le VRS.

A : Analyse par la cytométrie en flux de l'expression d'IL-4 et d'IFN- γ des cellules Th1 et Th2 générées. Les cellules Th1 et Th2 furent générées par la stimulation de lymphocytes de sang de cordon avec des mitogènes en présence d'IL-12 et d'Ac anti-IL-4 ou d'IL-4 et d'Ac anti-IL-12, respectivement. Les cellules néonatales stimulées sous des conditions de différenciation "Th1" produisent un haut niveau d'IFN γ mais peu d'IL-4, alors que les cellules T naïves stimulées en présence d'IL-4 et d'Ac anti-IL-12 produisent principalement l'IL-4. B : Infectivité du VRS chez les éosinophiles et les cellules Th1 ou Th2 et l'effet de la préincubation d'Ac anti-CCR3. Le VRS infecte préférentiellement les éosinophiles et les cellules Th2. L'Ac anti-CCR3 inhibe significativement l'infection du VRS chez les éosinophiles et les cellules Th2.

1.4 La gp90 initie le chimiotactisme des cellules Th2 et des éosinophiles

Histopathologiquement, l'infiltrat inflammatoire lors d'une bronchiolite au VRS est composé d'éosinophiles et des cellules T dont le profil des cytokines est de types Th2 (Legg et al., 2003). Différentes cytokines et chimiokines contribuent à l'accumulation de ces cellules inflammatoires dans le tractus respiratoire. Les protéines virales qui participent à ce processus sont inconnues. Nous avons investigué le rôle potentiel de l'induction de la migration nous sommes demandés si la gp90 du VRS pouvait induire *in vitro* le chimiotactisme des éosinophiles, des cellules T. Les cellules Th2, Th1 et les éosinophiles furent testées pour leur réponse chimiotactique à la gp90 (figure 17A, 17B, 17C). La gp90 induit une migration significative à la fois des cellules Th2 et des éosinophiles. L'intensité du flux migratoire des cellules en réponse à la gp90 est similaire à celle induite par l'éotaxine. La migration cellulaire induite par le gp90 est partiellement inhibée en présence d'un Ac anti-CCR3 suggérant que CCR3 soit impliqué dans ce processus. L'éotaxine et la gp90 induisent une migration minimale des cellules Th1 en comparaison avec MIP1 β .



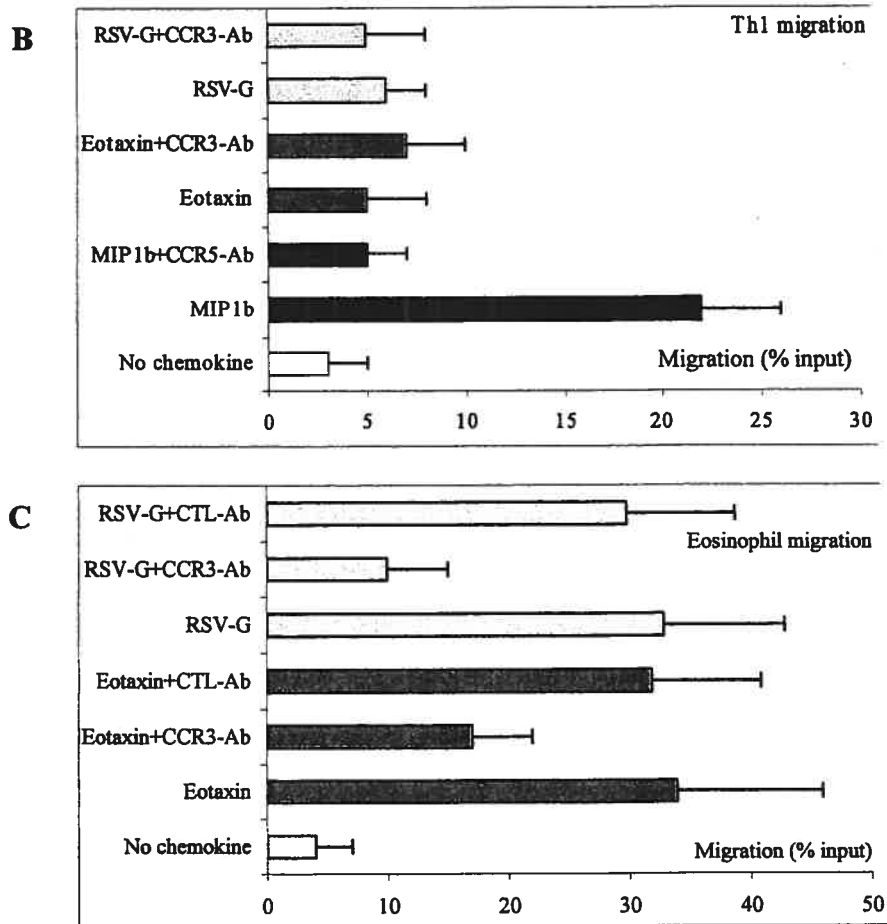


Figure 17 : Réponse chimiotactique des cellules Th2, Th1 et des éosinophiles.

Les réponses chimiotactiques des cellules Th2 (A), Th1 (B) et des éosinophiles (C) en réponse à l'éotaxine, MIP1 β et la gp90. Les données sont exprimées comme le pourcentage de cellules ayant migré. À la fois l'éotaxine et la gp90 induisent une migration significative des cellules Th2 et des éosinophiles laquelle est réduite par l'ajout d'Ac anti-CCR3. Les valeurs présentent la moyenne +/-SD de 4 expérimentations.

1.5 L'induction du mucus par la gp90 du VRS chez les cellules épithéliales A549

La surproduction de mucus est une caractéristique majeure des bronchiolites virales. Alors que les cytokines IL-9 et l'IL-13 sont des inductrices connues de la production de mucus, il est également possible que des protéines virales puissent contribuer à ce phénomène. La figure 18 montre que la gp90 du VRS induit la production de mucus chez les cellules épithéliales A549, laquelle est inhibée par un Ac anti-CCR3. Des effets similaires furent

observés avec l'éotaxine (figure 18A), la gp90 (figure 18C), l'IL9 (figure 18E) et l'IL13 (figure 18F). La présence d'Ac anti-CCR3 limite la production de mucus induite par l'éotaxine (figure 18B) ou la gp90 (figure 18D).

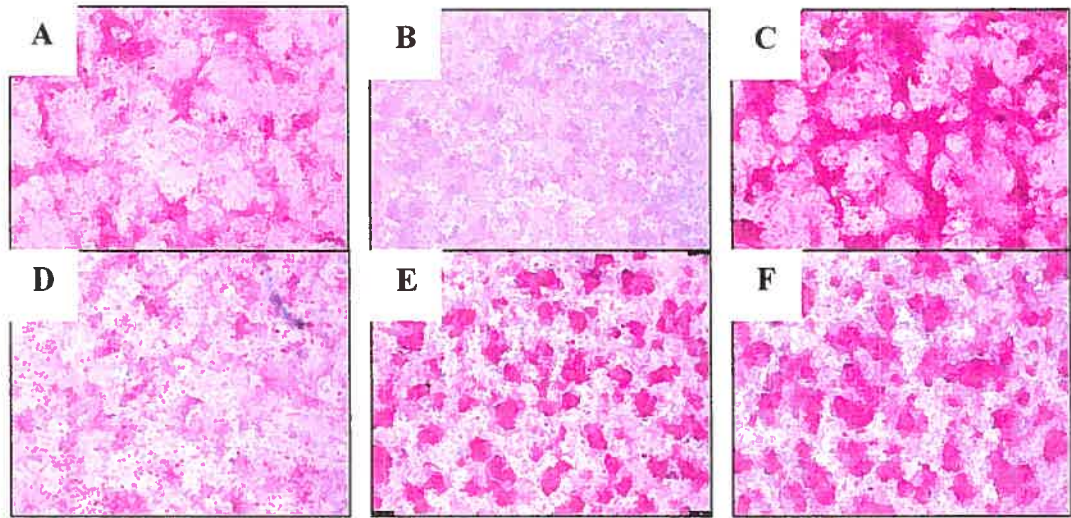


Figure 18 : Mucus induit par la gp90 chez les cellules épithéliales A549.

Les cellules A549 furent cultivées sur des lames et furent traitées avec l'éotaxine ou la gp90. Les cellules furent alors fixées à la formaline et les glycoconjugués muqueux furent visualisés par marquage à l'AB/PAS. L'éotaxine (A) et la gp90 (C) insuisent la production de mucus chez les cellules épithéliales A549. Des Ac anti-CCR3 inhibèrent la production de mucus induite par l'éotaxine (B) et la gp90 (D). L'IL9 (E) et l'IL13 (F) furent utilisées comme des contrôles positifs.

2. La régulation du CCR3 par les MMP

RÉGULATION DE L'INFECTION DU VRS EN CLIVANT SON RÉCEPTEUR CELLULAIRE PAR UNE MÉTALLOPROTÉASE (MMP).

Les MMPs constituent une famille de plus de 25 endopeptidases regroupées selon la spécificité de leur substrat. Une série de travaux récents ont démontré que certaines MMPs peuvent cliver les chimiokines au niveau NH₂-terminal et les transformer en molécules dotées soit d'un pouvoir inhibiteur de l'inflammation ou d'un pouvoir chimiotactique accru. En effet, certaines chimiokines clivées par des MMPs génèrent une forme tronquée de chimiokines qui agissent comme antagonistes et inhibe l'inflammation. Il est donc concevable que les récepteurs de chimiokines soient aussi un substrat pour les MMPs. Étant donné que ces récepteurs sont exprimés par différents types cellulaires et médient l'activité de multiples chimiokines, l'identification de protéinases avec une propriété anti-inflammatoire qui peut inactiver ces récepteurs est essentielle pour la compréhension des mécanismes naturels qui contrôlent l'inflammation. Dans ce cadre, nous avons choisi d'étudier la capacité des MMPs à couper les récepteurs des chimiokines et particulièrement le récepteur CCR3. **L'hypothèse générale à tester est que les MMPs sont capables de cliver les récepteurs de chimiokines et d'inhiber la migration des cellules inflammatoires ainsi que l'infection des cellules épithéliales par le virus respiratoire syncytial (VRS).**

Les expériences de cytofluorométrie en flux montrent que le clivage de CCR3 par la MMP7 prévient la liaison de l'éotaxine à son récepteur alors que la MMP7 n'a aucun effet sur la liaison d'une autre chimiokine de la même famille (MIP1 β) sur son récepteur CCR5. Par la technique d'immunobuvardage, nous avons mis en évidence le clivage de CCR3 par les MMP7. De plus, le clivage de CCR3 par la MMP7 est suivi d'une diminution de la migration des cellules épithéliales et des éosinophiles en réponse à l'éotaxine. Finalement, la forme tronquée de CCR3, un récepteur putatif impliqué dans l'interaction entre le VRS et les cellules épithéliales, après un traitement par la MMP7 résulte en une inhibition de l'infection. Donc, le clivage de CCR3 par MMP7 représente un nouveau mécanisme de contrôle de l'infection au VRS et de l'inflammation subséquente.

2.1 Effets des MMP sur CCR3

Nous avons tout d'abord déterminé le potentiel des différentes MMP (MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP9, MMP10, MMP12 et MMP13) utilisées, à différentes concentrations (10, 25, 50, 100 ng/ml) pour interférer la liaison de l'éotaxine aux cellules GHOST/CCR3 par cytométrie en flux (figure 19). De toutes les MMP testées, seules les traitements avec MMP7 et MMP12 induisent une inhibition de la liaison de l'éotaxine sur les cellules GHOST/CCR3. Pour les cellules GHOST/CCR5, utilisées comme contrôle, les pré-traitements avec MMP7 et MMP12 n'altèrent pas la liaison de MIP-1 β à son récepteur CCR5 (figure 19h-i) alors que le traitement avec MMP10 résulte en une légère augmentation d'affinité de MIP-1 β pour son récepteur (figure 19g). Ces données démontrent que MMP7 et MMP12 inhibent spécifiquement la liaison de l'éotaxine à son récepteur CCR3. Afin d'investiguer le mécanisme par lequel un pré-traitement avec MMP7 et MMP12 inhibe la liaison éotaxine-CCR3, nous avons testé l'habileté de ces MMP à cliver le récepteur CCR3. La figure 20 montre que l'incubation avec MMP7 induit un clivage de CCR3 tel que démontré par perte de poids moléculaire de CCR3 sur un gel de tris-tricine comparée à une incubation avec uniquement du milieu. Bien que le traitement par la MMP12 est associé avec une perte de la liaison de l'éotaxine au CCR3, la technique de Western blot ne montre pas d'effet clair de cette MMP sur CCR3 malgré plusieurs essais. CCR3 est fortement exprimé par les éosinophiles. Dès lors, nous avons testé également si le traitement avec les MMP interfère avec l'intégrité des propriétés de liaison de CCR3 par des Ac anti-CCR3 marqués. À cet égard, les éosinophiles furent incubés avec MMP7 uniquement, vu que seule cette MMP clive CCR3. La figure 21 montre que ce traitement altère la liaison des Ac anti-CCR3 aux éosinophiles suggérant que l'activité protéolytique de MMP7 soit aussi applicable à ce type cellulaire.

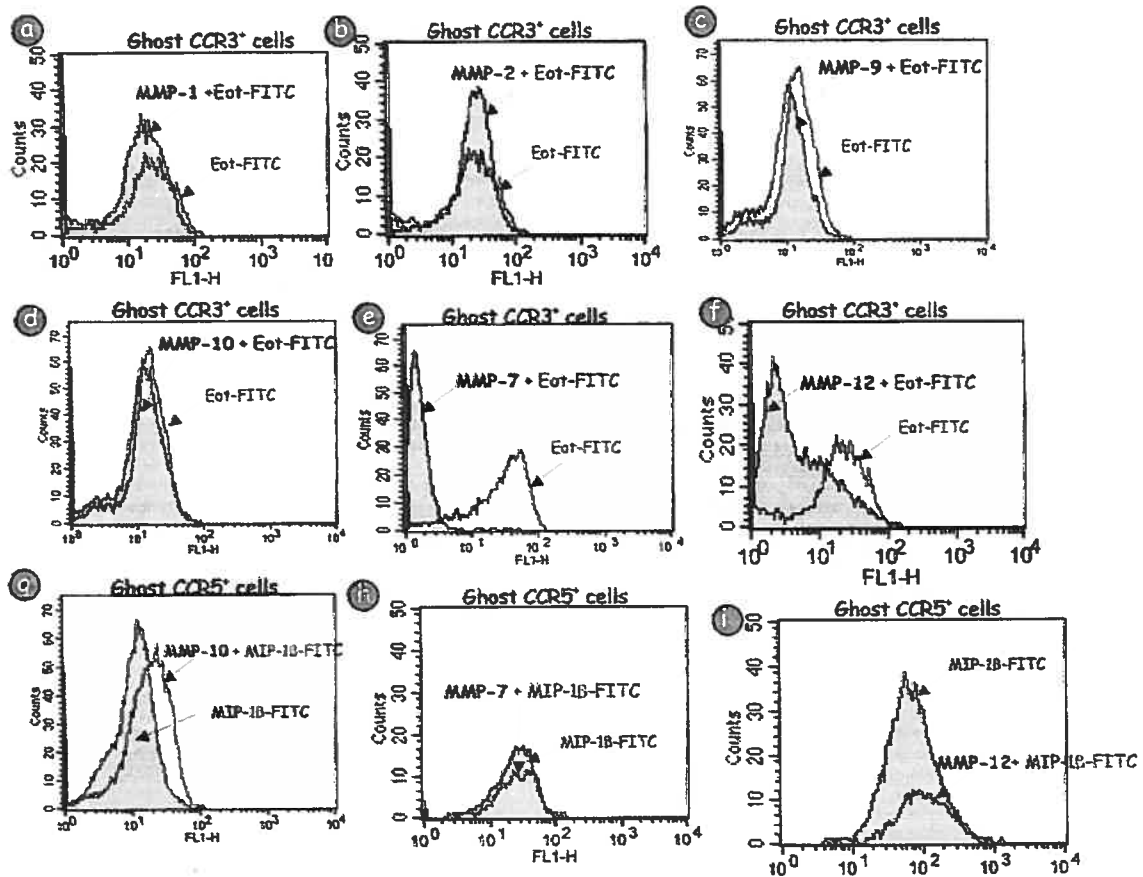


Figure 19 : Effets des MMP sur la liaison de l'éotaxine ou de MIP1 β .

Les effets des MMP sur la liaison de l'éotaxine ou de MIP1 β sur les GHOST/CCR3 (a-f) ou GHOST/CCR5 (g-i). Les cellules furent incubées avec différentes MMP (50 ng/ml) durant 3 h et la liaison du ligand sur son récepteur respectif fut analysée par la cytométrie en flux. Parmi toutes les MMP testées, MMP7 (e) et MMP12 (f) réduisent la liaison de l'éotaxine à son récepteur chez les cellules GHOST/CCR3. Comme contrôle, les cellules GHOST/CCR5 (g-i) furent utilisées et aucune des MMP testées n'altère la liaison de MIP1 β .

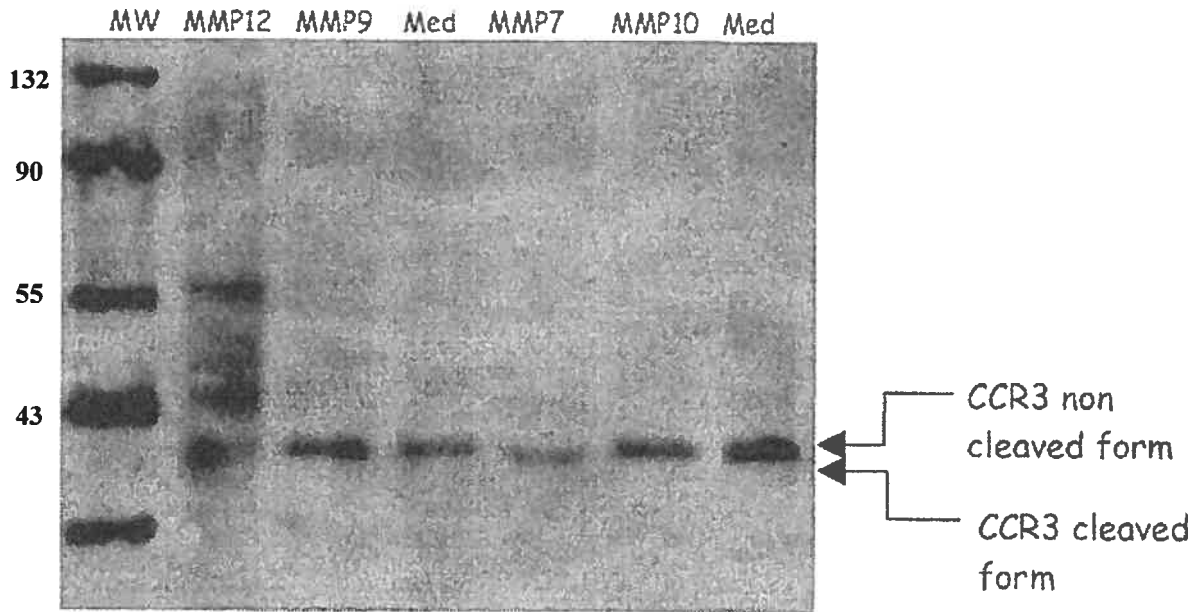


Figure 20 : CCR3 est un substrat pour MMP7.

Les cellules GHOST/CCR3 furent incubées avec différentes MMP (50 ng/ml) pour 3 h. Le clivage de CCR3 fut évalué *via* l'analyse sur gel de tris-tricine par un Ac anti-CCR3. Parmi toutes les MMP, seule la MMP7 induit une augmentation claire de la mobilité électrophorétique comparée aux cellules traitées uniquement avec du milieu (Med).

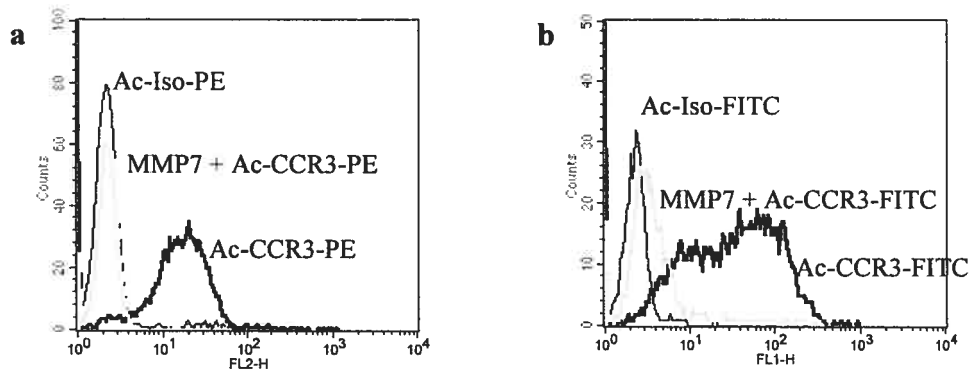


Figure 21 : L'effet de MMP7 sur la capacité de liaison de CCR3 des éosinophiles.

La liaison des Ac anti-CCR3 couplés au PE (a) ou au FITC (b) à des éosinophiles fraîchement isolés et pré-incubés avec MMP7 ou du milieu seul fut analysé par cytométrie en flux.

2.2 Le clivage de CCR3 par MMP7 inhibe la réponse migratoire cellulaire

Nous avons utilisé le chimiotactisme pour évaluer si le clivage de CCR3 par MMP7 affecte la migration des cellules CCR3+ en réponse à l'éotaxine. Nos résultats montrent qu'à la

fois les cellules GHOST/CCR3 et des éosinophiles migrent en réponse à l'éotaxine (figure 22). Une réduction de la réponse migratoire des cellules GHOST/CCR3 et des éosinophiles fut observée lorsque ces cellules furent pré-incubées avec MMP7 à une concentration de 50 ng/ml. Donc, l'activité protéolytique de CCR3 par MMP7 résulte en une inhibition de la migration cellulaire.

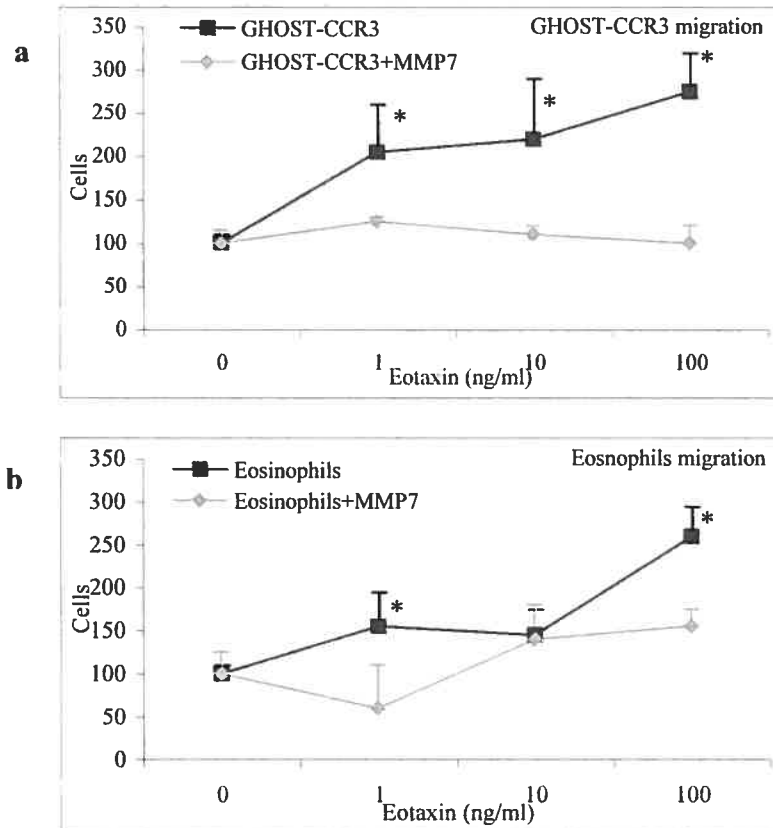


Figure 22 : Effets de la MMP7 sur la réponse migratoire des cellules GHOST/CCR3 (a) et des éosinophiles (b) à l'éotaxine.

La migration cellulaire fut évaluée par la chambre de Boyden. Les résultats sont présentés en pourcentage de cellules ayant migré. La migration induite par l'éotaxine est comparée à la migration de cellules en réponse au milieu uniquement +SEM. * $p < 0.05$ comparé aux cellules non traitées.

2.3 Le CCR3 clivé par la MMP7 empêche l'infection des cellules de l'épithélium respiratoire par le VRS

Nous avons précédemment montré que les cellules de l'épithélium respiratoire expriment CCR3 lequel est impliqué dans l'interaction du VRS. Nous avons dès lors déterminé les effets du traitement de différentes MMP sur l'infectivité du VRS sur des cellules épithéliales Hep2. L'infectivité du VRS fut évaluée par une technique d'immunomarquage. Parmi les MMP testées, seule l'effet de la MMP7 induit une inhibition significative (inhibition $66\% \pm 4$) de l'infection au VRS (tableau 2). La pré-incubation avec MMP13 est associée avec une légère mais non significative augmentation de l'infectivité du VRS. Ces données suggèrent que la protéolyse de CCR3 par MMP7 prévient la liaison de la gp90 du VRS au CCR3 et subséquemment, l'infection.

Traitement	% d'inhibition (moy. +/- SEM)
MMP1	5 +/- 6
MMP2	7 +/- 9
MMP3	2 +/- 10
MMP7	66 +/- 4 *
MMP9	1 +/- 4
MMP12	4 +/- 4
MMP13	-8 +/- 12

Tableau 4 : Effets des MMP sur l'infectivité du VRS sur les cellules épithéliales Hep2.

Parmi toutes les MMP testées, seulement MMP7 induit une réduction de l'infection du VRS (66% inhibition).

* $p < 0.05$ comparé à l'infection du VRS de cellules incubées avec du milieu uniquement.

3. Les effets d'un glucocorticoïde sur CCR3

RÉGULATION DE L'INFECTION DU VRS EN MODULANT SON RÉCEPTEUR CELLULAIRE PAR DES GLUCOCORTICOÏDES.

Le virus respiratoire syncytial (VRS) est une cause majeure des infections du tractus respiratoire chez les enfants et induit l'exacerbation d'asthme à tout âge. Les bénéfices cliniques d'une thérapie à base de glucocorticoïdes pour l'infection au VRS sont controversés. **L'objectif de cette étude est de déterminer les effets du propionate de fluticasone (FP) sur l'infection du VRS et sur l'expression des récepteurs de chimiokines potentiellement impliqués dans l'interaction cellules épithéliales / VRS.** Nous avons démontré que des cellules respiratoires épithéliales prétraitées par du FP à une concentration de 10^{-7} M durant 48 heures diminue la formation de plaques infectieuses virales chez les Hep2 alors qu'un pré-traitement à une concentration de 10^{-5} M augmente significativement la formation de plaques infectieuses spécifiques au VRS. Parallèlement, une inhibition significative de l'expression du récepteur de chimiokine CCR3, récepteur potentiel du VRS sur les cellules épithéliales, est observée lorsque les cellules sont traitées avec le FP à une concentration de 10^{-7} M. En contrepartie, une augmentation de l'expression de CCR3 a été montrée lorsque les cellules sont traitées avec une concentration de FP à 10^{-5} M. En conclusion, une faible dose de FP réduit l'infectivité du VRS dans les cellules épithéliales. L'inhibition de l'expression de CCR3 pourrait fournir un nouveau mécanisme par lequel, les corticostéroïdes modulent l'infectivité du VRS.

3.1 Activité antivirale du FP sur les cellules Hep2 et des explants nasaux

L'effet d'un glucocorticoïde, le FP, utilisé à différentes concentrations sur l'infection du VRS chez les cellules Hep2 est montré à la figure 23. Le FP utilisé à des concentrations de (10^{-5} M, 10^{-6} M et 10^{-7} M) n'affectent pas la formation de plaques de lyses chez les cellules Hep2 lorsque les cellules sont traitées à 12, 24 ou 36 h avant l'infection virale. Après une période de pré-traitement de 48 h, le FP affecte la formation de plaques de manière dose-dépendente. Une augmentation de la formation de plaque d'infection est observée lorsque les cellules sont pré-traitées avec le FP à une concentration de 10^{-5} M, comparée à des cellules non-traitées ($p < 0.01$). Le traitement au FP à une concentration de 10^{-7} M pendant 48 h, diminue la formation de plaques de 30 % bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative. Afin d'évaluer l'effet du FP sur l'infection du VRS dans une situation plus physiologique, une expérience similaire a été conduite sur des explants de la muqueuse nasale cultivés *ex vivo* comme modèle d'infection du tractus respiratoire supérieur. Pour cette expérimentation, une dose unique de FP fut testée (10^{-7} M) laquelle représente une concentration de drogue pouvant atteindre les tissus *in vivo* (Powell and Gibson, 2003; Price, 2000). L'infection des explants par le VRS n'altérait pas l'intégrité des tissus suite à une inspection visuelle. Comme attendu, le nombre de cellules exprimant la protéine F du VRS fut plus élevé dans les explants infectés en comparaison aux explants non infectés (figure 24). Le pré-traitement avec le FP, réduit l'infection virale des tissus nasaux en comparaison aux explants infectés par le VRS mais non traités ($p < 0.05$). Il est intéressant de souligner qu'un petit nombre de cellules exprimant la protéine F du VRS fut observé dans les explants nasaux non infectés, lequel peut représenter des protéines du VRS persistantes dans les tissus de patients naturellement infectés avant la chirurgie.

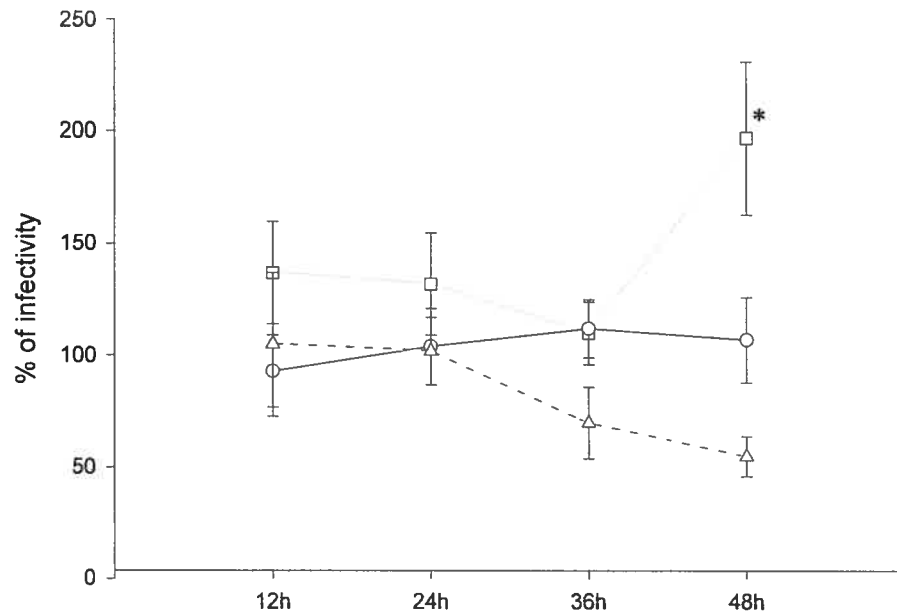


Figure 23 : Pourcentage d'infection du VRS sur les cellules Hep-2 pré-traitées avec différentes dilutions de FP.

Les effets de différentes concentrations de FP (ligne bleue pointillée : 10^{-7} M, ligne noire : 10^{-6} M, ligne grise : 10^{-5} M) sur l'infection virale de cellules Hep2 sont présentés. Le pourcentage de l'infectivité est représenté en comparaison aux cellules non traitées (100%). (*) À 48 h post infection, une augmentation de la formation de plaque d'infection fut observée lorsque les cellules furent traitées avec le FP à une concentration de 10^{-5} M en comparaison à des cellules non traitées ($p < 0.01$).

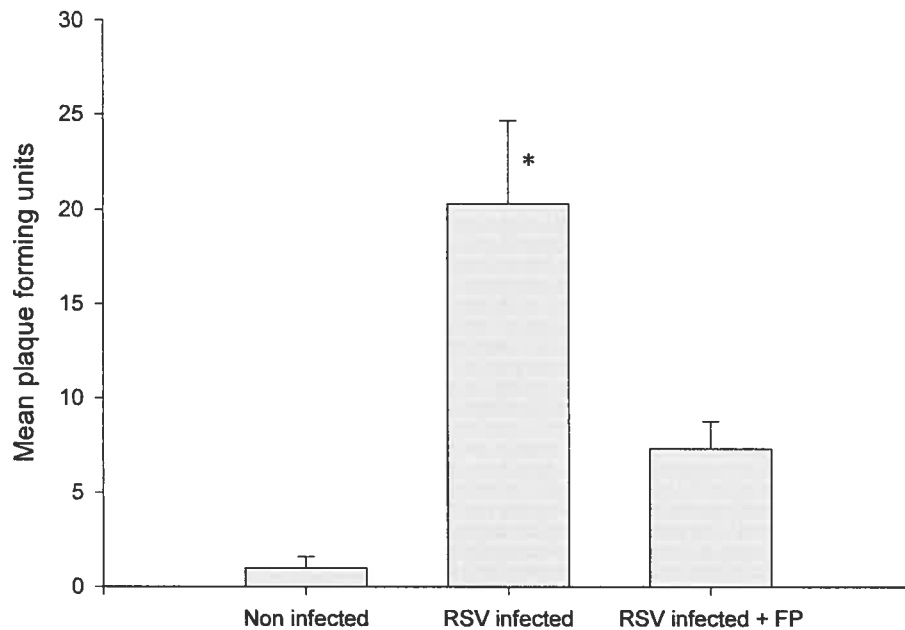


Figure 24 : Moyenne du nombre de formation de plaques sur des biopsies nasales infectées et pré-traitées par le FP.

Le graphe représente la moyenne du nombre de cellules exprimant la protéine F du VRS dans des biopsies nasales (non infectées) infectées (RSV) et traitées par le FP à 10^{-7} M (RSV + FP). (*) Le pré-traitement avec le FP réduit significativement l'infektivité virale des tissus nasaux comparé à des explants non traités et infectés ($p < 0.05$).

Pour déterminer si l'effet du FP sur l'infektivité au VRS pouvait être liée au changement de l'expression des récepteurs de chimiokines, potentiellement impliqués à l'entrée virale sur les cellules épithéliales, les effets du FP sur l'expression de CX3CR1 et de CCR3 furent évalués par cytométrie en flux. Nos résultats ont montré que l'expression de CX3CR1 sur les cellules Hep-2 ne fut pas altérée par le FP à différentes concentrations. Toutefois, le pré-traitement par le FP durant 48 h à une concentration de 10^{-7} M réduit significativement l'expression de CCR3 (54.0 ± 7.56 % cellules positives, $p < 0.05$) alors que l'expression de ce récepteur de chimiokine augmenta significativement à une concentration de 10^{-5} M (80.3 ± 5.80 cellules positives, $p < 0.05$) comparativement à l'expression détectée chez les cellules non traitées (68.0 ± 8.07 % cellules positives, $n = 3$).

DISCUSSION

Nous avons démontré que l'interaction entre la gp90 du VRS et le récepteur de chimiokine CCR3 contribue à l'infection du VRS.

La caractérisation de récepteurs viraux est primordiale pour maîtriser leur propagation. En effet, les virus sont des parasites intracellulaires qui ont communément une phase extracellulaire dans leur cycle de reproduction. Les virus ont élaboré un procédé pour transporter leur matériel génétique à travers la barrière cellulaire pour commencer un nouveau cycle infectieux. La structure et les propriétés de la barrière cellulaire sont des facteurs restrictifs critiques de l'hôte pour les virus. Virtuellement, chaque type de molécules exposées à la surface de la cellule peut être potentiellement exploitées comme récepteur viral. Afin de circonscrire toute virémie, la stratégie la plus évidente et directe de prévenir l'infection est d'empêcher le virus de se lier à son récepteur primaire et de bloquer le processus de pénétration.

Les trois principaux apports apportés par ce programme de recherche sont que : (1) le récepteur de chimiokine CCR3 est considéré comme récepteur du virus respiratoire syncytial et cette interaction joue un rôle dans l'entrée virale et dans l'immunopathologie. (titre de l'article en préparation : *Chemokine receptor CCR3 as respiratory syncytial virus receptor : Role in viral entry and immunopathology*) ; (2) le clivage du récepteur de l'éotaxine (CCR3) par la métalloprotéinases 7 affecte le chimiotactisme des cellules CCR3⁺ et cette protéolyse du récepteur inhibe l'infection du virus respiratoire syncytial (titre de l'article en préparation : *Truncation of eotaxin receptor (CCR3) by matrix metalloproteinases affects chemotaxis and inhibits respiratory syncytial virus infection*) ; et (3) l'effet d'un glucocorticoïde, comme le propionate de fluticasone, régule l'infection du virus respiratoire syncytial sur une lignée cellulaire respiratoire en interférant avec la synthèse du récepteur de chimiokine CCR3 (titre de l'article en préparation : *Effects of fluticasone propionate on respiratory syncytial virus infectivity in a respiratory epithelial cell line*). Tout ceci démontre l'importance du récepteur de chimiokine CCR3 lors d'une infection au VRS *in vitro*.

(1) Le récepteur de chimiokine CCR3 est considéré comme récepteur du virus respiratoire syncytial et cette interaction joue un rôle dans l'entrée virale et dans l'immunopathologie.

Déjà, en 2001, Tripp et ses collègues (Tripp et al., 2001) avaient identifié dans l'ectodomaine de la gp90 nommé « heparin binding domain » (HBD), une région qui contient le motif CX3C caractéristique de la chimiokine CX3CL1 (fractalkine). Ce motif permet à la gp90 du VRS de se lier au récepteur CX3CR1 et d'initier un effet chimiotactique sur les leucocytes murins et humains. Toutefois, la fraktalkine a un minimum d'homologie en acides aminés avec la gp90. Ceci n'a rien d'étonnant car, malgré que la glycoprotéine membranaire (gp)120 du VIH n'ait ni séquences en acides aminés et ni de redéploiement structurel semblable aux chimiokines, celle-ci peut quand même exploiter des récepteurs de chimiokines. Cet exemple le plus notoire du mimétisme moléculaire permet de cibler l'infection *via* plusieurs récepteurs de chimiokine comme les CCR5, CCR2b, CCR3 et CXCR4 (Moore et al., 1997; Stantchev and Broder, 2001). Un seul pathogène peut donc utiliser différents récepteurs de chimiokines pour pénétrer différents types cellulaires, perturber le système immunitaire ou potentiellement infecter des hôtes distincts.

Nos travaux démontrent que (1) le récepteur CCR3 interagit physiquement avec la glycoprotéine G du VRS, (2) l'infection au VRS est inhibée par le ligand naturel du VRS, à savoir l'éotaxine et que (3), la gp90 du VRS induit le chimiotactisme des cellules CCR3⁺. Comme les cellules épithéliales sont la route d'entrée principale pour le VRS, nous avons tout d'abord confirmé, au niveau ribonucléique (ARN) et au niveau protéique, l'expression du récepteur de chimiokine CCR3 par ces cellules. Pour corrélérer la présence de CCR3 sur les cellules épithéliales avec une infection au VRS, des cellules GHOST transfectées par le récepteur CCR3 ont été infectées par le VRS. Ces cellules transfectées sont plus permissives au VRS que des cellules identiques non transfectées par ce même récepteur de chimiokine. Plus spécifiquement, un anticorps anti-CCR3 est capable de diminuer l'infection au VRS durant l'adsorption du virus à des cellules épithéliales respiratoire Hep2. De même, l'addition dans le milieu de culture de CCL11 (éotaxine), le ligand naturel du CCR3, atténue l'infectivité du VRS *in vitro*. Ces données démontrent que le contact entre la protéine d'attachement du VRS des cellules épithéliales s'initie par la liaison avec

le récepteur CCR3 *in vitro*. Toutefois, il reste à préciser, par des expériences de mutagenèse dirigée, où se situe sur le récepteur CCR3, l'interaction exacte avec la gp90 du VRS. Bien que nos résultats démontrent l'importance de la liaison gp90 et CCR3 dans l'infection au VRS, une inhibition totale de l'infection au VRS via le blocage de CCR3 uniquement n'est pas réaliste vu 1/ l'importance dans l'infection d'autres récepteurs et 2/ le rôle complexe de la protéine G membranaire dans l'infection. Quoiqu'il en soit, le récepteur CCR3 semble un bon candidat comme cible thérapeutique pour diminuer l'infection et la pathologie subséquente. Nous n'avons aucune idée de l'impacte clinique de cette inhibition car il nous manque des données *in vivo*. Mais, en nous basant sur la littérature dans lesquelles d'autres récepteurs ont été bloqués, nous apprenons que le VRS persiste plus longtemps dans les poumons de souris invalidées pour le gène TLR4 et infectées par le VRS, comparées à des souris normales (Kurt-Jones et al., . 2000). Aussi, Tripp et ses collaborateurs ont montré que l'absence du motif CX3C de la glycoprotéine G du VRS ou lors d'un traitement avec un Ac anti-CX3CR1 durant une vaccination (VRS inactivé à la formaline) ou un challenge, réduisent ou diminuent la maladie pulmonaire et la réponse T anti-virale à l'infection au VRS (Harcourt et al., 2006; Haynes et al., 2003). Selon nous, le plus probable serait donc une infection atténuée mais malgré tout, on ne peut éliminer le fait que l'infection puisse être ralentie.

Nous avons démontré, la gp90 peut interférer avec des récepteurs de chimiokines, et particulier le CCR3. Nous avons donc examiné si le VRS peut infecter les cellules de l'épithélium respiratoire qui expriment ce même récepteur. Selon nos travaux, le ligand naturel du récepteur CCR3, l'éotaxine (CCL11), interfère *in vitro* avec l'entrée du VRS dans ces cellules épithéliales cibles. Dans les mêmes conditions, l'anticorps anti-CCR3 diminue l'infection. En plus des cellules de l'épithélium respiratoire, CCR3 est également exprimé par les éosinophiles (Ponath et al., 1996), les cellules Th2, alors que les cellules Th1 n'en expriment que très peu (Mackay, 2001; Sallusto et al., 1997; Stein and Nombela-Arrieta, 2005). Les LT de type Th2, de type Th1 et les éosinophiles supportent la réplication du VRS. Toutefois, le nombre de cellules Th1 infectées est inférieur à celui des cellules de type Th2. L'addition d'anticorps anti-CCR3 aux éosinophiles et aux LT de type Th2 inhibe l'infection par le VRS. Pour les cellules Th1, cet anticorps n'a pas d'effet, suggérant que le VRS emploie un récepteur différent de CCR3 sur ces lymphocytes. Les

cellules de l'immunité sont donc des cibles pour le VRS et le contact initial se déroule *via* le CCR3. Les cellules épithéliales ne sont donc pas les seules cibles pour le VRS. D'autres leucocytes comme les basophiles (Ugucioni et al., 1997) et les mastocytes (Romagnani et al., 1999) présentent le récepteur CCR3 et sont également présents dans le tractus respiratoire lors d'une infection. Il ne serait donc pas surprenant que le VRS puisse également infecter ces cellules.

(2) Le clivage du récepteur de l'éotaxine (CCR3) par la métalloprotéinases 7 affecte le chimiotactisme des cellules CCR3⁺ et cette protéolyse du récepteur inhibe l'infection du virus respiratoire syncytial.

Sur la base de la caractérisation d'un récepteur impliqué dans l'infection du VRS, une stratégie possible pour prévenir l'infection du VRS consiste à agir sur l'interaction entre le virus et ce récepteur. À cet égard, une possibilité est d'agir directement sur CCR3 en l'inactivant par clivage. Selon nos travaux, des candidats potentiels seraient les métalloprotéases (MMP) grâce à leur activité protéolytique. En effet, mis à part les composants de la matrice extracellulaire, les MMP ont également comme substrat d'autres composés dont les chimiokines. Les chimiokines clivées par des MMP se lient à leur(s) récepteur(s) respectif(s) mais n'induisent ni de flux de calcium intracellulaire, ni de chimiotactisme (McQuibban et al., 2001; McQuibban et al., 2000; McQuibban et al., 2002). Ces formes tronquées agissent comme des antagonistes de chimiokines. Nous avons démontré pour la première fois un processus protéolytique d'un récepteur de chimiokine, en l'occurrence CCR3, par des MMP.

Nos travaux démontrent que MMP7, et possiblement MMP12, clivent CCR3 et le convertissent en un récepteur inactif. Bien qu'il n'ait pas encore été démontré que les MMP soient impliquées dans un mécanisme de défense *in vivo* contre des agents viraux, différentes preuves existent déjà démontrant la contribution de MMP7 dans l'immunité innée (Burke, 2004). Cette MMP, exprimée par l'épithélium respiratoire (Dunsmore et al., 1998; Lopez-Boado et al., 2001), semble un candidat potentiel pour cette fonction. En effet, nos données démontrent le clivage de CCR3 par MMP7. Les conséquences physiologiques de cette dégradation sont une réduction de la capacité d'infectivité du VRS. Ces données

suggèrent un rôle anti-viral de MMP7 et illustrent une autre voie par laquelle MMP7 participe à la réponse immune. Ces données offrent de belles perspectives. Ainsi il pourrait être envisagé le potentiel protéolytique de MMP7 sur CCR3 exprimés par d'autres lignées épithéliales respiratoires. De plus, il reste à estimer le site de clivage de CCR3 par MMP7 par spectrométrie de masse. Toutefois, des études biophysiques par des techniques de NMR sur le domaines CCR3 indiquent que la partie N-terminale du récepteur est le déterminant majeur pour la liaison de CCL11 (éotaxine) (Ye et al., 2000). L'interaction entre la deuxième loupe extra-cellulaire du récepteur de chimiokine CCR3 et CCL11 est aussi interférée par l'ajout d'un peptide dérivé de la deuxième loupe extra-cellulaire du récepteur de chimiokine, contrairement aux peptides issus de la première et troisième loupe extra-cellulaire, lesquels ne montrent pas d'indication de liaison avec la chimiokine (Fernandez and Lolis, 2002; Ye et al., 2000). Cette spécificité pourrait sans doute se rapporter à l'activité de la MMP7 qui pourrait couper dans l'une de ces deux régions, empêchant tant la liaison de l'éotaxine et de la gp90 du VRS, qui semblent se chevaucher, au récepteur CCR3. Une manière élégante pour vérifier la localisation exacte du clivage serait de construire des mutants de délétions successives de la région N-terminale de CCR3. Cette région est de loin la partie la plus exposée en surface cellulaire de CCR3. Des substitutions de résidus choisis seraient sélectionnées et, à chaque mutant identifié, une molécule de luciférase y serait insérée. L'activité de clivage des MMP serait analysée par cytométrie en flux où le clivage par les MMP traduirait une diminution de l'intensité. Dans ce dernier cas, l'action de lyse de ces MMP aura engendré une perte de la molécule fluorescente dans la région N-terminal du mutant-CCR3 construit. Par ailleurs, il serait intéressant de déterminer si l'expression et l'activation de MMP7 sont induites lors d'une infection au VRS *in vitro*.

Les MMP7 sont les MMP structurellement les plus simples car elles ne contiennent pas, contrairement aux autres membres de la famille, de domaines homologues de l'hémopexine (Brinckerhoff and Matrisian, 2002). La MMP7 ne présente que trois domaines de base requis pour la sécrétion et l'activité (Das et al., 2003). Cette structure particulière pourrait soit résulter de son évolution à partir de structures ancestrales, soit représenter une forme primitive des métalloprotéases qui se constituerait alors par ajout d'exons Ceci expliquerait

ce large éventail de protéines clivées par rapport aux autres MMP. En effet, cette MMP pourrait représenter une forme rudimentaire des MMP qui la rendrait moins spécifique (Das et al., 2003; Massova et al., 1998). Aussi, vu sa structure simplifiée, la MMP7 est la plus petite MMP avec un poids moléculaire de 19 kDa (Burke, 2004). Cette petite taille limiterait l'encombrement allostérique et permettrait à cette MMP de s'insérer entre les boucles extracellulaires des récepteurs de chimiokines pour les cliver. Une autre conséquence fonctionnelle de cette protéolyse du CCR3 par MMP7 en un récepteur inactif est la réduction de la capacité migratoire *in vitro* des cellules CCR3⁺ en réponse à CCL11. Toutefois, les conséquences de la dégradation de CCR3 par les MMP sur la migration cellulaire *in vivo* doivent encore être élucidées. Cette activité pourrait être déterminée en modifiant la migration de cellules immunes traitées par MMP7, transférées par voie intraveineuse et ensuite récupérées au niveau du poumon pour déterminer si ces cellules modifiées migrent vers le tractus respiratoire après l'infection au VRS. D'autres perspectives d'investigation des conséquences fonctionnelles de la protéolyse de CCR3 par MMP7 incluent l'étude de la mobilisation du calcium intracellulaire en réponse à CCL11. Toutefois, nos données biochimiques et cellulaires montrent clairement le potentiel de clivage et d'inactivation de CCR3 par MMP7 indiquant que dans des situations physiologiques et pathologiques, l'activité de MMP a le potentiel de moduler de multiples processus cellulaires médiés par CCR3. Cette régulation de l'activité d'un récepteur de chimiokine pourrait avoir un impact dans des processus inflammatoires variés impliquant le récepteur CCR3, et plus particulièrement les processus inflammatoires de type allergique ou asthmatique (Humbles et al., 2002; Ma et al., 2002; Panina-Bordignon and D'Ambrosio, 2003). Finalement, la protéolyse des récepteurs de chimiokines (CCR3, ...) par les MMP pourrait également avoir un impact dans les processus néoplasiques et les mécanismes reliés à l'invasion et au développement des métastases (Egeblad and Werb, 2002). Toutefois, il reste encore à déterminer *in vivo* le clivage de CCR3 par la MMP7. Pour analyser l'intégrité du récepteur de chimiokine sous l'action de cette MMP, lors d'une situation pathologique (infection au VRS, asthme, cancer) ou physiologique (organogénèse), il serait envisageable de prélever directement au site adéquat, des cellules. Ainsi, il pourrait être déterminé le statut opérationnel du récepteur de chimiokine suite à sa probable dégradation par les MMP dans une situation *in vivo*. La régulation des récepteurs

de chimiokine par les MMP peut avoir des conséquences physiologiques dans d'autres processus impliquant la migration cellulaire tel que l'organogenèse et l'angiogénèse.

(3) L'effet d'un glucocorticoïde, comme le propionate de fluticasone, régule l'infection du virus respiratoire syncytial sur une lignée cellulaire respiratoire en interférant avec la synthèse du récepteur de chimiokine CCR3.

Les corticostéroïdes sont communément employés dans le traitement de la bronchiolite à VRS, quoique leur efficacité soit controversée (Buckingham et al., 2002; Cade et al., 2000; Garrison et al., 2000; Patel et al., 2004; van Woensel et al., 2003). De plus, l'efficacité des corticostéroïdes dans le confinement de l'infection et l'élimination du virus n'a pas été démontrée. Les corticostéroïdes sont reconnus comme étant des agents anti-inflammatoires très efficaces en diminuant la production de cytokines et de chimiokines par les cellules inflammatoires. Leur activité sur les récepteurs de chimiokines est peu connue. Nous avons dès lors entrepris d'évaluer les effets du propionate de fluticasone (FP) sur l'infection au VRS *in vitro* sur des cellules épithéliales et *ex vivo* dans un modèle humain de biopsies de la muqueuse nasale. Nous avons également déterminé les effets de FP sur l'expression de récepteurs de chimiokines potentiellement impliqués dans l'interaction initiale du VRS avec les cellules hôtes.

Nos résultats démontrent que la FP affecte l'infectivité des cellules épithéliales par le VRS de façon dose dépendante. Une dose élevée de FP augmente la formation de plaques infectieuses dans les cellules respiratoires Hep2 alors qu'une faible dose réduit l'infectivité du VRS. Pour élucider le mécanisme par lequel FP module l'infectivité du VRS, nous avons déterminé sur l'effet du FP sur l'expression des récepteurs de chimiokines impliqués dans l'interaction cellules épithéliales/VRS (Tripp et al., 2001). Nos résultats démontrent que FP module l'expression du récepteur CCR3 de façon dose dépendante. Ainsi, la FP module à la hausse ou à la baisse l'expression de CCR3 parallèlement à son effet sur l'infectivité du VRS. Par ailleurs, FP n'altère pas l'expression du récepteur CX3CR1 lequel interagit également avec la gp90 du VRS. Afin d'évaluer les effets du FP dans un modèle plus proche d'un environnement *in vivo*, des expériences d'infection similaires ont été conduites *ex vivo*, en utilisant des explants de muqueuse nasale comme modèle d'infection

du tractus respiratoire supérieur. Nos résultats démontrent que FP utilisé à une concentration de 10^{-7} M diminue l'infectivité du VRS. Parallèlement, des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour vérifier la diminution de l'expression du récepteur CCR3 sur ces cellules après traitement. Les corticostéroïdes peuvent induire l'apoptose des cellules épithéliales tant *in vitro* qu'*in vivo* (Dorscheid et al., 2001; Dorscheid et al., 2003; Dorscheid et al., 2006) et prévenir ainsi la prolifération des cellules épithéliales du tractus respiratoire. Même si la dose employée dans les articles de Dorscheid (10 μ M) est équivalente à celles utilisées lors de nos expérimentations (10^{-5} M à 10^{-7} M), nous ne connaissons pas l'équivalence entre les deux corticostéroïdes utilisés. Une hypothèse que nous pouvons apporter serait que l'apoptose rendrait les cellules épithéliales plus susceptibles au VRS, les rendant ainsi plus infectables par exposition de récepteurs et de ligands impliqués dans l'interaction VRS-cellules épithéliales. Selon Noah et al., l'utilisation de FP à une concentration similaire inhibe l'induction de CXCL8 et de CCL5 par le VRS mais n'influence pas l'excrétion du VRS de cellules BEAS-2B infectées (Noah et al., 1998). La raison de cet écart entre nos résultats et les leurs peut s'expliquer par la souche virale utilisée, le type cellulaire et la technique employée pour l'évaluation de l'infectivité. Il est également possible que les interactions cellules-cellules et cellules-matrice des muqueuses nasales de nos explants puissent influencer l'effet anti-viral des FP. Nous ne pouvons exclure l'effet de l'âge dans l'effet des glucocorticoïdes sur l'infectivité du VRS. Dans notre étude, les tissus nasaux furent obtenus d'enfants âgés de plus d'un an. Or, la bronchiolite à VRS affecte principalement les nourrissons âgés de moins d'un an bien que l'infection respiratoire à VRS survienne à tout âge tant chez l'enfant que chez l'adulte. À cet égard, la dexaméthasone inhibe la production de CXCL8 induite par le VRS dans les lymphocytes circulants isolés d'enfants et les adultes mais non de nourrissons, suggérant que les effets des corticostéroïdes pourraient être dépendants de l'âge (Thomas et al., 2002).

Pour déterminer l'effet du FP sur l'infection du VRS *in vitro* d'une façon qui reproduit le plus possible une situation *in vivo*, les doses testées doivent s'apparenter aux concentrations atteintes dans les tissus pulmonaires *in vivo*. Selon Esmailpour, la concentration de FP retrouvée dans le sérum varie de 0-0.22nM qui est +/- 100 x plus petite que la concentration trouvée dans les tissus périphériques des poumons (0-12nM) suite à l'inhalation d'une dose

unique de PF de 1 mg (Esmailpour et al., 1997). Cette concentration tissulaire semble être 1000 fois inférieure à celle utilisée dans nos expériences *in vitro*. Il est fort probable que les concentrations de FP retrouvées localement en regard de l'épithélium bronchique soient supérieures à ces concentrations calculées puisqu'*in vivo* le FP est administré par inhalation. Il est à noter que la biodisponibilité du FP, c'est-à-dire la concentration de drogue qui peut atteindre le tissu visé est de +/- 2% (http://us.gsk.com/products/assets/us_flonase.pdf) et que plusieurs facteurs déterminent la déposition des glucocorticoïdes par inhalation. Selon notre étude, l'utilisation du FP à forte concentration augmente la formation de plaque infectieuse dans les cellules épithéliales Hep2, ouvrant la possibilité que les glucocorticoïdes utilisés à hautes doses pourraient être néfastes. Malheureusement, la taille des spécimens chirurgicaux des muqueuses nasales nous a empêché d'étudier l'effet du FP sur le VRS à une concentration de 10^{-5} M. Par ailleurs, pour des raisons éthiques, il n'a pas été possible de déterminer l'effet de FP sur l'infection virale modulée par le FP dans des tissus du tractus respiratoire inférieur.

Une hypothèse pour expliquer les mécanismes par lequel une faible dose de FP inhibe l'infectivité du VRS pourrait être proposée. Le virus interagit avec une variété de molécules exprimées à la surface cellulaire, incluant les récepteurs de chimiokines, dont certaines sont sensibles à l'action de glucocorticoïdes (Caulfield et al., 2002; Nagase et al., 2000; Penton-Rol et al., 1999; Silvestri et al., 2002). La modulation de l'expression du récepteur CCR3 par le FP en parallèle à l'effet du FP sur l'infectivité du VRS suggère que ces deux phénomènes sont reliés. Par contre, le manque d'effet de FP sur CX3CR1 suggère que ce récepteur n'est pas une cible du FP. Nos expériences effectuées sur les explants de muqueuses nasales soulèvent d'autres hypothèses. À l'inverse des lignées cellulaires, ces explants sont un modèle plus complexe d'interaction cellules-cellules, cellules-matrice extracellulaire. Comme les glucocorticoïdes ont un large spectre d'activation sur les fonctions cellulaires, il est possible que les FP puissent altérer l'expression et les fonctions d'autres récepteurs ou molécules de surface impliqués dans l'interaction cellules hôte – VRS. Par exemple, les glucocorticoïdes régulent à la baisse l'expression de certains membres de la famille des TLR (Homma et al., 2004), également perçus comme récepteurs du VRS (Kurt-Jones et al., 2000). I

Il reste improbable que les jeunes enfants soient traités préventivement avec des glucocorticoïdes avant une éventuelle infection à VRS. Donc, dans le futur, nous pourrions élaborer un protocole où des cellules épithéliales seraient infectées par le VRS concomitamment ou avant l'administration du FP aux doses identiques étudiées. Ces résultats permettraient de nous informer si l'administration, postérieure à une infection au VRS, a les mêmes conséquences que nos résultats obtenus lors de l'administration de FP antérieure au VRS.

En conclusion, une faible dose de FP réduit l'infection du VRS des cellules de la muqueuse respiratoire du tractus respiratoire supérieur. L'inhibition de récepteur CCR3 concomitante pourrait fournir un nouveau mécanisme par lequel les glucocorticoïdes réduisent l'infection virale.

Pour résumer les résultats obtenus : il y a au moins deux raisons importantes pour identifier des récepteurs d'un virus sur les cellules hôtes. Premièrement, l'expression des récepteurs détermine le tropisme du virus, assure sa propagation et joue un rôle clé dans sa pathogénèse. Deuxièmement, la caractérisation d'un récepteur viral facilite le profil d'un vaccin ou d'agents antiviraux qui pourraient intervenir tôt durant l'infection virale. Dans notre cas, CCR3 représente potentiellement une cible thérapeutique pour une intervention pharmacologique. Comme le VRS se localise principalement dans le tractus respiratoire, il serait possible de dessiner des agents thérapeutiques sous forme d'aérosols pour prévenir ou traiter l'infection à VRS en empêchant l'attachement du virus à son récepteur. Les récepteurs de chimiokines sont une cible attrayante pour l'élaboration d'agents thérapeutiques pour plusieurs raisons : (a) contrairement aux protéines virales, les récepteurs de chimiokines sont des structures cellulaires hautement conservées ; (b) il existe déjà différentes molécules ciblant efficacement les récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à la protéine G dont font partie les récepteurs de chimiokines ; (c) les inhibiteurs de récepteurs de chimiokines auraient l'avantage de stopper le virus avant qu'il n'entre dans la cellule, c'est à dire empêchant potentiellement l'établissement d'un réservoir cellulaire ou d'une latence ; (d) l'expérience acquise avec le VIH démontre qu'il n'existe pas encore de variants ayant l'habileté d'infecter des cellules d'une manière indépendante du récepteur de chimiokine impliqué et que les ligands naturels des

récepteurs de chimiokines bloquent efficacement l'infection du VIH. Notre travail s'inscrit dans cette démarche. En effet, même si nous n'avons pas entamé l'étape suivante, à savoir travaillé sur des spécimens *in vivo*, l'identification du récepteur de chimiokine CCR3 comme récepteur potentiel du VRS nous a incité à élaborer des modèles pour réduire l'infection du VRS. Cette diminution peut s'initier en (1) bloquant le récepteur de chimiokine par la ligand naturel correspondant ; en (2) clivant le récepteur de chimiokine par une MMP ; en (3) modulant le récepteur de chimiokines par des glucocorticoïdes.

Notre but ultime est de fournir les bases pour une nouvelle approche thérapeutique pour le traitement des bronchiolites et possiblement de l'asthme en élucidant les mécanismes d'interaction entre le VRS et l'hôte. Nous avons démontré qu'en bloquant le récepteur CCR3, nous inhibons l'infection du VRS : ce récepteur de chimiokine représente donc une excellente cible pour l'élaboration d'agents antagonistes. Les antagonistes du récepteur CCR3 peuvent être soit des *antagonistes de récepteurs de chimiokines dérivés de chimiokines modifiées* (peptides de récepteurs de chimiokines), soit des dérivés de composants non peptidiques lipophiles appelés des *antagonistes de récepteurs de petits poids moléculaires* (petites molécules) (Elsner et al., 2004; Heveker, 2001; Proudfoot, 2002; Santoro et al., 2004) ou bien soit des protéines virales exploitants des récepteurs de chimiokines (revue dans : Alcamí, 2003; Rosenkilde, 2005).

Les antagonistes de récepteurs de chimiokines dérivés de peptides sont des chimiokines ayant subi des modifications au niveau de leur région N-terminale (Loetscher et al., 2001). Ces transformations sont soit des délétions ou des extensions d'acides aminés soit des altérations chimiques. Par exemple, la chimiokine CCL5 (RANTES) modifiée en Met-RANTES (Proudfoot et al., 1996), AOP-RANTES (Simmons et al., 1997) ou NNY-RANTES (Mosier et al., 1999) a une activité anti-VIH *in vitro* supérieure à la chimiokine initiale RANTES. Met-RANTES prévient le recrutement de cellules inflammatoires, en l'occurrence les éosinophiles, dans les tissus (Teixeira et al., 1997) alors que AOP-RANTES active et internalise le récepteur CCR3 des éosinophiles (Elsner et al., 2001). Ces différentes altérations pourraient être appliquée à l'éotaxine (CCL11) pour prévenir l'infection au VRS. D'autres antagonistes de récepteurs de chimiokines dérivés de peptides sont à l'essai mais, à ce jour, soit ils ne lient pas le CCR3, soit ils ne sont pas complètement

antagonistes (eotaxine traitée par le CD26/dipeptidylpeptidase IV) (Elsner et al., 2004; Proudfoot, 2002). Les antagonistes de récepteurs de petits poids moléculaires (peptides synthétiques dérivés de chimiokines) représentent une autre forme de thérapie sélective. Ils sont caractérisés par un faible poids moléculaire qui leur permettrait d'être données par voie orale. Le nombre élevé d'études et de brevets montre l'intérêt suscité par ces composants bien qu'actuellement peu de résultats *in vivo* soient publiés (Altmeyer, 2004; Elsner et al., 2004; Proudfoot, 2002). Finalement, l'habileté qu'ont certaines protéines virales d'interférer avec les récepteurs de chimiokines pourrait représenter une stratégie efficace pour inhiber l'infection du VRS. Déjà, il a été démontré que la vMIP2, par son interaction avec le récepteur CCR5, a une activité inhibitrice lors d'infections du VIH ou du VIS (Kanbara et al., 2000; Lutichau et al., 2001; Stine et al., 2000; Zhou et al., 2000). Un autre exemple concerne la cyclophilin (C-18) produite par le *Toxoplasma gondii* qui lie le récepteur de chimiokine CCR5 (Golding et al., 2003) et prévient l'infection des souches VIH-R5 (Golding et al., 2005; Yarovinsky et al., 2004). Des études supplémentaires spécifiques pour le récepteur CCR3 pourraient être entamées afin de déterminer leur potentiel comme agent thérapeutique anti-VRS. Toutefois, l'immunogénicité de ces protéines virales pourrait induire des réponses anticorps, compromettre l'activité de ces protéines et limiter leur emploi comme thérapie dans des pathologies chroniques. Des stratégies pour diminuer l'immunogénicité sont à mettre en œuvre pour nous permettre de bénéficier de ces protéines virales.

In vivo, une augmentation du niveau de CCL5, de CCL3, de CXCL8 et de CCL11 a été rapportée dans le tractus respiratoire après une infection des cellules au VRS (Blanco et al., 2002; Harrison et al., 1999; Miller et al., 2004; Olszewska-Pazdrak et al., 1998a). Les conséquences fonctionnelles de l'expression de ces chimiokines par les cellules épithéliales ne seraient pas seulement reliées au recrutement de cellules inflammatoires, mais pourraient être également un mécanisme impliqué dans l'élimination de l'infection virale en entrant en compétition avec le virus pour le récepteur.

L'activité issue de la liaison entre la gp90 du VRS et le récepteur de chimiokine CCR3 peut expliquer le fait que la gp90 soit liée à la pathogenèse de l'infection au VRS, à la sévérité de sa maladie durant la primo infection et la vaccination.

- Tout d'abord, l'accumulation au niveau du tractus respiratoire de la gp90 explique l'accumulation de mucus observé lors d'une infection au VRS. Nous avons qu'une sécrétion excessive des cellules à gobelets du tractus respiratoire contribue à la morbidité et à la mortalité associée à l'asthme et suite à l'infection du tractus respiratoire par le VRS (Blyth et al., 1998; Fahy, 2002; Kagnoff and Eckmann, 1997). L'épithélium respiratoire normal est tapissé de mucus, sécrété par les cellules à gobelets et les glandes sub-mucosales (Burgel and Nadel, 2004; Kim, 1997). Cette sécrétion assure, en condition normale une variété de fonctions protectrices : il protège le tractus respiratoire inférieur et les alvéoles de la déshydratation et des dommages des particules inhalées, des pathogènes ou des irritants chimiques (Holtzman et al., 2002; Kagnoff and Eckmann, 1997). Bien que les mécanismes de régulation de cette hypersécrétion restent peu compris, Miller *et al.* (Miller et al., 2003), il semble que le récepteur CXCR2 contribue à la production excessive de mucus lors d'une infection au VRS. Nous avons également étudié l'effet direct de la gp90 sur la production de mucus par la lignée cellulaire épithéliale respiratoire A-549. Nos résultats démontrent qu'à la fois l'éotaxine et la gp90 induisent la production de mucus par les cellules respiratoires. Par contre, l'anticorps anti-CCR3 n'est pas capable d'inhiber complètement la production de mucus par la gp90 ce qui suggère que d'autres mécanismes indépendants du CCR3 soient impliqués dans la production de mucus (Miller et al., 2003).

- Deuxièmement, sur le volet immunologique, l'intensité de la maladie est reliée à une accumulation excessive d'éosinophiles et à une réponse immune inadéquate de phénotype Th2 (Alwan and Openshaw, 1993; Pemberton et al., 1987). Chez la souris, la forme sécrétée de la gp90 est liée à l'induction des cytokines de types Th2 et une éosinophilie pulmonaire (Johnson and Graham, 1999; Johnson et al., 1998). Le mimétisme moléculaire de l'éotaxine par la forme sécrétée de la gp90 peut donc également impliquer la contribution du récepteur CCR3 dans l'infection puisque CCR3 est le seul récepteur identifié actuellement pour l'éotaxine. L'implication de la gp90 dans le recrutement d'éosinophiles et des LT de type Th2 ou Th1 a été évaluée. *In vitro*, la gp90 induit la migration des éosinophiles et les LT-Th2 alors qu'elle n'a qu'une faible activité

chimiotactique sur les LT-Th1. Précisément, cette activité chimiotactique de la forme sécrétée de la gp90 est inhibée lorsque le CCR3 est bloqué par un anticorps anti-CCR3 sur les LT-Th2. La signification exacte de l'infection spécifique des éosinophiles et des LT-Th2 par le VRS reste à préciser. Toutefois, il est possible que l'infection de ces types cellulaires assure la propagation virale et contribue à une inflammation préjudiciable. En conséquence, l'accumulation de ces cellules représente une nouvelle source de cytokines Th2 et prédispose à une réponse immune de type Th2 inadéquate. Il est probable que d'autres leucocytes exprimant le récepteur CCR3 comme les mastocytes et les basophiles soient également attirés par la gp90. Cette arrivée excessive de cellules peut aussi soutenir la prolifération du virus, coopérer à la dysrégulation du système immunitaire et contribuer à sa pathogénèse. Nous savons que l'infection au VRS représente près de 70% de tous les cas de bronchiolites infantiles (Fonseca Cde and Grisi, 2003; Gern, 2004; Openshaw et al., 2003) et plusieurs études suggèrent que cette manifestation clinique du VRS est un facteur important pour le développement de l'asthme (Gern, 2004; Holt and Sly, 2002; Kimpen, 2001; Mallia and Johnston, 2002; Message and Johnston, 2002; Sigurs, 2001). L'infiltrat inflammatoire d'un asthmatique est caractérisé par des éosinophiles, des mastocytes, des basophiles et des LT exprimant des cytokines de types Th2 (Lemanske and Busse, 2003; Muro et al., 2000; Renauld, 2001). Les infections au VRS survenant tôt dans l'enfance (moins d'un an), c'est à dire lorsque le système immunitaire est encore dans un état foetal préférentiellement de type Th2, renforce une immunité primaire polarisée en Th2 au niveau du tractus respiratoire (Holt and Sly, 2002). Le scénario suivant a été proposé. Par l'entremise de sa gp90, le VRS durant ce stade précoce favorise le développement d'une polarisation Th2 spécifique (Elias et al., 2003; Openshaw, 2001). Cet état immunitaire rendrait les infections ultérieures plus sévères en raison de la diminution de la capacité de la défense immunitaire initiée par les LTh1 et par une augmentation de la composante Th2 (en particulier les éosinophiles) de la réponse de l'hôte. Cet état inflammatoire atypique qui accompagne les bronchiolites à VRS sensibiliserait le tractus respiratoire et le mettrait dans un état d'hypersensibilité (Openshaw, 2001; Osur, 2002; Papadopoulos et al., 2003; Piedimonte, 2002). Néanmoins, la relation précise entre la bronchiolite à VRS et l'asthme n'a pas encore été clairement établie (revue dans : Gern, 2004; Holt and Sly, 2002; Kimpen, 2001; Message and Johnston, 2002; Peebles, 2004). Deux hypothèses sont

proposées (Fonseca Cde and Grisi, 2003; Mallia and Johnston, 2002; Message and Johnston, 2002; Peebles, 2004). Premièrement, les manifestations cliniques de la bronchiolite surviennent parce que l'individu a des prédispositions (hypersensibilité individuelle à des allergènes communs, une hyperréactivité bronchique du tractus respiratoire, des désordres reliés à l'anatomie ou la physiologie pulmonaire), lesquelles sont responsables des symptômes subséquents. Dans ce cas, le virus pourrait être une marque de cette condition. Une deuxième hypothèse propose que l'infection au VRS dans la phase précoce de la vie pourrait être directement responsable de l'asthme. Durant un épisode de bronchiolite, les dommages dans la muqueuse du tractus respiratoire des poumons immatures sont causés par une réponse inflammatoire. Cette infection altère la réponse immune et contribue à la sensibilité à d'autres antigènes ou expose des récepteurs aux irritants impliqués dans l'asthme. Il est à noter qu'une association significative entre l'asthme et le polymorphisme génétique de CCR3 a été trouvée dans certaines populations (Fukunaga et al., 2001).

Globalement, ces résultats suggèrent que la gp90 contribue de façon importante à la réponse inflammatoire, à la pathogenèse induite lors de l'infection au VRS et à sa relation à l'asthme *via* le récepteur CCR3.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La revue du symposium international sur le VRS en 2004 s'est terminée par quelques questions essentielles sur la biologie du VRS en vue d'un développement d'une thérapie et d'une intervention préventive contre le VRS. La première de ces questions fut « Quel est le récepteur et le co-récepteur du VRS ? » (Schmidt et al., 2004) tant la notion de récepteur viral est primordiale pour l'élaboration d'une thérapie efficace. Nous pensons avoir contribué dans ce domaine en démontrant que le récepteur de chimiokine CCR3 est un récepteur potentiel pour le VRS et que l'interaction entre ce même récepteur et la glycoprotéine membranaire G du VRS est aussi responsable de la pathogenèse du virus, comme nous le montrons schématiquement dans la figure 25. Bien que le VRS ait été identifié depuis 40 ans, aucun vaccin n'a encore été approuvé et aucun traitement spécifique n'existe. Approximativement 2000 études ont été publiées sur la biologie VRS et progressivement le mystère entourant ce virus s'éclaircit car le développement d'un vaccin demeure dépendant d'une meilleure compréhension de l'immunobiologie du VRS.

Les multiples stratégies de subversion développées par le VRS *via* sa gp90 pour éviter l'éradication immune peuvent expliquer les échecs des interventions thérapeutiques antérieures. Une thérapie exige non seulement une réponse anti-virale forte mais également l'atténuation des facteurs critiques qui initient la sévérité de la maladie. La compréhension de la fonction et du mécanisme d'action de la gp90 devrait faciliter la découverte d'inhibiteurs appropriés. Afin de limiter la virémie, une stratégie pour prévenir l'infection est d'empêcher le virus de se lier à son récepteur primaire et de bloquer le processus de pénétration. Le récepteur viral peut-être considéré comme une cible thérapeutique. Un agent thérapeutique bloquant les effets de la gp90 et son interaction avec le récepteur de chimiokine CCR3 devrait augmenter la sensibilité du VRS au système immunitaire de l'hôte. Quoiqu'il en soit, la relation entre le récepteur de chimiokine CCR3 et le VRS reste complexe. En dépit de l'apparente redondance du système des chimiokines, il semble que l'identification d'antagonistes spécifiques aux récepteurs de chimiokines soit faisable. Le récepteur de chimiokine CCR3 serait donc une bonne cible thérapeutique pour traiter et prévenir l'infection au VRS ainsi que ses complications.

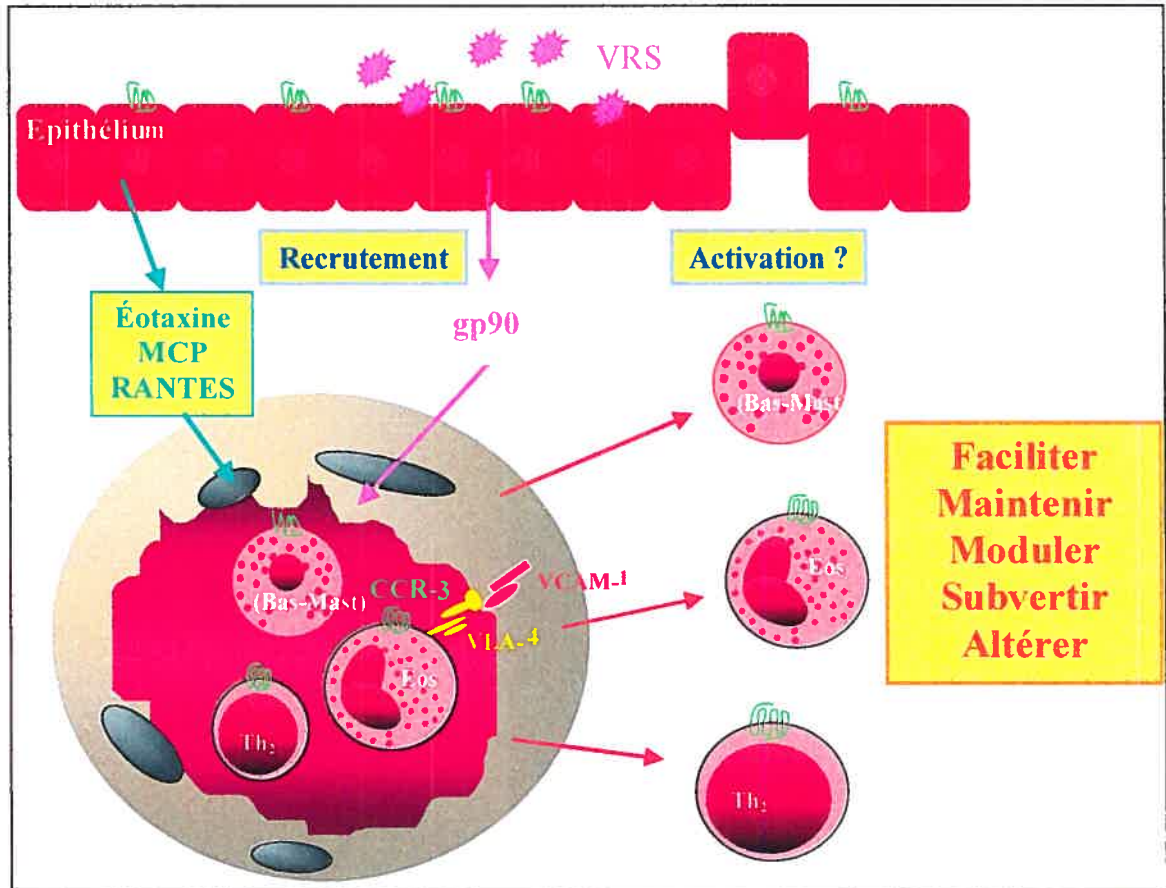


Figure 25 : Schéma hypothétique de l'action conjuguée des chimiokines et de la gp90 du VRS sur les cellules CCR3⁺.

Lors de l'infection de l'épithélium du tractus respiratoire par le VRS, différentes chimiokines sont produites. De même, la fraction sécrétée de la gp90 du VRS est excrétée. Ces protéines (chimiokines et gp90) agiraient en synergie sur le recrutement de cellules immunes CCR3⁺. Cette mobilisation excessive de cellules faciliterait la dispersion virale en maintenant et modulant la réponse immunitaire vers le type Th2. Cette subversion de la réponse immunitaire altérerait l'éradication virale. Reste à vérifier l'activation des cellules immunes CCR3⁺ par la gp90.

Des modifications telles que des délétions, des extensions d'acides aminés ou des altérations chimiques comme celles appliquées à la chimiokine CCL5 (RANTES) modifiées en Met-RANTES, AOP-RANTES ou NNY-RANTES, viseraient la gp90 du VRS. Cette gp90 ainsi arrangée devrait probablement contenir les infections du VRS au niveau du tractus respiratoire. Une toute autre stratégie pourrait être envisagée. Nous connaissons déjà le potentiel des vCKBP comme agent thérapeutique chez différents modèles animaux. En effet, par exemple, l'administration de vCKBP dirigée contre le CCL11, inhibe l'inflammation éosinophilique tissulaire dans un modèle murin d'asthme (Dabbagh et al., 2000). Dans ce contexte cette protéine virale pourrait probablement être testée contre la gp90 du VRS et ainsi atténuer ses effets sur les cellules immunes CCR3⁺. Nos résultats sur

la limitation de l'infection du VRS en se basant sur le contrôle de son récepteur, ouvrent la voie à d'autres investigations dans le domaine des infections virales ou parasitaires. Comme le récepteur de chimiokine CCR3 agit également comme un co-récepteur pour le VIH, la forme clivée de celui-ci par MMP7 pourrait avoir un potentiel important et une implication dans l'infection du VIH (He et al., 1997). D'autres MMP, non étudiées durant cette thèse, pourraient aussi être évaluées pour leur capacité à tronquer les différents récepteurs de chimiokines impliqués également dans l'infection du VIH ou du *Plasmodium*.

Bien que les résultats *in vitro* montrent que l'éotaxine et un anticorps anti-CCR3 inhibe la liaison au VRS, son rôle dans l'éradication virale *in vivo* reste à être déterminé. Pour confirmer toutes ces hypothèses soulevées et afin de déterminer le rôle des chimiokines dans la défense anti-virale de l'hôte, l'étape subséquente reste l'étude sur le modèle *in vivo*. Des comparatifs d'infection au VRS pourraient se faire chez des souris invalidées pour le gène CCR3. Dans la même optique, des protocoles infection pourraient également se reproduire chez des souris sauvages dont le gène CCR3 serait inactivé par des oligonucléotides antisens, ou par des anticorps neutralisants bloquant le récepteur. Aussi, la contribution de MMP7 pourrait être évaluée en comparant la gravité d'une infection au VRS entre un modèle de souris sauvages et un modèle de souris invalidées pour le gène MMP7. Les bénéfices du passage de l'*in vitro* sur des modèles *in vivo* devraient apporter une autre dimension aux résultats obtenus.

ANNEXES

1. Articles publiés durant le programme de doctorat

Gounni Abdelilah S, Wellemans V, Agouli M, Guenounou M, Hamid Q, Beck LA, Lamkhioued B. Increased expression of Th(2)-associated chemokines in bullous pemphigoid disease. Role of eosinophils in the production and release of these chemokines. *Clin Immunol.* 2006 Jun 15.

Soussi Gounni Abdelilah, Vincent Wellemans, Jia Yang, Fabienne Bellesort, Kamrouz Kassiri, Sophie Gangloff, Moncef Guenounou, Andrew J. Halayko, Qutayba Hamid, and Bouchaib Lamkhioued. Human airway smooth muscle cells express the high affinity receptor for IgE (FcεRI): A critical role of FcεRI in human airway smooth muscle cell function. *J Immunol.* 2005 Aug 15;175(4):2613-21.

Philippe Joubert, Stéphane Lajoie-Kadoch, Isabelle Labonté, Abdelilah Soussi Gounni, Karim Maghni, Vincent Wellemans, Jamila Chakir, Michel Laviolette, Qutayba A. Hamid and Bouchaib Lamkhioued. CCR3 expression and function in asthmatic airway smooth muscle cells. *Journal of Immunology* 2005 Aug 15;175(4):2702-8.

Wellemans V., Laurent S., Hélie P., ElAzahry Y. Immunostimulatory properties of a novel adjuvant administered with inactivated influenza virus vaccine. *Veterinary Immunology and Immunopathology. Vet. Res.* 2007 Jan-Feb;38(1):1-14.

David Francoz, Jean-Martin Lapointe, Vincent Wellemans, André Desrochers, Jeff Caswell, Jeff Stott, Pascal Dubreuil. IgG2 deficiency with transient hypogammaglobulinemia and chronic respiratory disease in a six month-old holstein heifer. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 2004 Sep ; 16(5) : 432-5.

2. Articles en voie de publication durant le programme de doctorat

Les résultats (p51-p61) devraient faire partie d'un article en voie de soumission :

Vincent Wellemans, Fabienne Bellessort, Sophie Laberge, Bouchaib Lambkioued. Chemokine Receptor CCR3 as Respiratory Syncytial Virus Receptor : Roles in Viral Entry and Immunopathology of the Lung.

Les résultats (p62-p67) devraient faire partie d'un article en voie de soumission :

Vincent Wellemans, Hassan Ait benhassou, Soussi gounni abdelilah, Moncef Guenounou, Sophie Laberge and Bouchaib Lamkhioued. Truncation of Eotaxin Receptor (CCR3) by Matrix Metalloproteinases Affects Chemotaxis and Inhibits Respiratory Syncytial Virus infection.

Les résultats (p68-p71) devraient faire partie d'un article en voie de soumission :

Vincent Wellemans, M.Sc., Sophie Laberge, M.D., Fabienne Bellessort, M.Sc., Bouchaib Lambkioued, Ph.D. Effects of Fluticasone Propionate on RSV infectivity in a respiratory epithelial cell line.

3. Participations aux congrès durant le programme de doctorat

V. Wellemans, F. Bellessort, B. Lamkhioued. Mimétisme des chimiokines par la glycoprotéine (G) d'attachement du VRS.(2005). XX^{ème} congrès annuel de la recherche des étudiants gradués et post-gradués, Montréal, Canada, Juin 2005.

V. Wellemans, F. Bellessort, B. Lamkhioued. RSV-G protein mimicry of chemokines.(2003). Association des Pneumologues de la Province de Québec - Le Réseau en Santé Respiratoire, Québec, Canada, Novembre 2003.

V. Wellemans, F. Bellessort, B. Lamkhioued. RSV-G protein mimicry of chemokines.(2003). Euroconférences: Chemokines-2, Paris, France, Octobre 2003.

V. Wellemans, F. Bellessort, B. Lamkhioued. RSV-G protein mimicry of chemokines.(2003). BioContact, Québec, Canada, Octobre 2003.

Soussi Gouni A., **Wellemans V.**, Kamrouz K., Halayko A., Hamid Q., Lamkhioued B. Human airway smooth muscle cells express the high affinity receptor for IgE (FcεRI). (2003). World Allergy Organisation, Vancouver, Canada, Septembre 2003.

V. Wellemans, F. Bellessort, B. Lamkhioued. RSV G Glycoprotein is a Selective Th₂ Chemoattractant. (2003). World Allergy Organisation, Vancouver, Canada, Septembre 2003.

F. Bellessort, **V. Wellemans**, B. Lamkhioued. Chemokine Receptors as RSV Receptors: Roles in Viral Entry and Immunopathology of the Lung. (2003). World Allergy Organisation, Vancouver, Canada, Septembre 2003.

Joubert, P., Lajoie-Kadoch, S., Wellemans, V., Soussi-Gounni, A., Maghni, K., Laporte, J.D., Chakir, J., Laviolette, M., Labonté, I., Hamid, Q.A., Lamkhioued, B. (2003). Expression of CCR3 by airway smooth muscle cells : functional implications in asthma. American Thoracic Society, Seattle, Washington, U.S.A, May 2003 .

4. Permissions de publication de figures

Objet: RE: Microbes and Infection
Date: Mon, 15 Jan 2007 14:53:50 -0000
De: "Jones, Jennifer (ELS-OXF)" [REDACTED]
À: [REDACTED]
Cc: "ELHLPDSK (ELS)" <elechlpdsk@elsevier.com>

 Picture (Metafile)

Dear Vincent Wellemans


We hereby grant you permission to reprint the material detailed below at no charge in your thesis subject to the following conditions:

1. If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies.
2. Suitable acknowledgment to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier".

3. Your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form.
4. Reproduction of this material is confined to the purpose for which permission is hereby given.
5. This permission is granted for non-exclusive world English rights only. For other languages please reapply separately for each one required. Permission excludes use in an electronic form other than submission. Should you have a specific electronic project in mind please reapply for permission
6. This includes permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission.

Yours sincerely

 Picture (Metafile)

Jennifer Jones
Rights Assistant

Your future requests will be handled more quickly if you complete the online form at www.elsevier.com/permissions

-----Original Message-----

From: ELHLPDSK (ELS)
Sent: 12 January 2007 22:44
To: Rights and Permissions (ELS)
Cc: [REDACTED]
Subject: FW: SD Comment- [Canada] {Academic} inforeq

Dear Permissions Team:

Please assist this customer with his request for your office. Thank you.

Please let us know if we can be of any further assistance or provide you with additional information on Elsevier products.

Respectfully yours,

James Hunt
ScienceDirect Electronic Support
360 Park Ave. South
New York, NY 10010
Email: usinfo@sciencedirect.com
Toll-free telephone: +1 (888) 437-4636 (Option.1)
Local: +1 (212) 633-3730 (Option.1)
Web Site: www.sciencedirect.com

-----Original Message-----

From: ScienceDirect Message Center [<mailto:contactus@prod.sciencedirect.com>]
Sent: Friday, January 12, 2007 3:16 PM
To: ELHLPDSK (ELS)
Subject: SD Comment- [Canada] {Academic} inforeq

This comment has been sent from the following URL - <http://www.sciencedirect.com/science?>

_ob=HomePageURL&_method=userHomePage&_btn=Y&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=6b8f8a0bb11c4ebe676f09e6d7da52c8

The browser type is - Mozilla/4.0 (compatible; MSIE 7.0; Windows NT 5.1; .NET CLR 1.1.4322; .NET CLR 2.0.50727)

The IP address is: 66.110.153.144

Account Name: ScienceDirect Guests

Account Number: C000050221

Sent by: wellemans

Organization Type: Academic

Full email address [REDACTED]

Telephone number [REDACTED]

Country: Canada

Location: Elsewhere (home, hotel, airport, internet cafe, etc.)

Subject: Information requests (prices, marketing, reports, reproduction of articles, etc)

Details:

Dear editor

I'm a student in the Department of Medicine at the « Université de Montréal », Québec, Canada. Presently, I'm writing my thesis and I would like to insert a figure from one paper that you have previously published. The publication is

Holst, P.J., and M.M. Rosenkilde. 2003. Microbiological exploitation of the chemokine system. *Microbes Infect.* 5:179-87.

I ask you the permission to insert this figure edited in your journal. Indeed, this figure is important for the comprehension of the introduction of my PhD thesis.

I hope you will see no inconvenience and you allow me to insert it into my PhD thesis introductions.

Regards

Vincent wellemans

Université de Montréal
[REDACTED]

Pièces jointes

Fichiers :

 **ole0.bmp** (26k)

 **ole1.bmp** (21k)



Imprimer - Fermer cette fenêtre

Objet: RE: RE : RE: Copyright permission
Date: Mon, 15 Jan 2007 14:02:47 +0100
De: "Rights and Permissions" <permission@karger.ch>
À: "vincent wellemans" [redacted]

Dear Dr Wellemans

Thank you for the additional information provided.

I am pleased to inform you that permission is granted herewith to use figure 1 from the article

Murdoch C, Finn A: J Vasc Res 2000;37:1-7

in your PhD thesis provided that complete credit is given to the original source and S. Karger AG, Basel is mentioned.

I hope that I have been of assistance to you with the above.

Yours sincerely

Tina Schaefer
Rights and Permissions

S. Karger AG
Medical and Scientific Publishers
Allschwilerstrasse 10
CH - 4009 Basel
Tel +41 61 306 14 76
Fax +41 61 306 12 34
E-Mail permission@karger.ch

From: vincent wellemans [mailto:[redacted]]
Sent: Monday, January 15, 2007 1:20 PM
To: Rights and Permissions
Subject: RE : RE: Copyright permission

Dear Editor,

The figure that I intend to use is the Figure 1, pp3033.

Regards

vincent wellemans

Rights and Permissions <permission@karger.ch> a écrit :

Dear Dr Wellemans

Thank you for your e-mail below.

Before I can process your request, may I kindly ask you to clarify which figure you intend to use, since there are several figures in the article in question. Thank you.

I now look forward to hearing from you again.

Yours sincerely

Tina Schaefer
Rights and Permissions
S. Karger AG
Medical and Scientific Publishers
Allschwilerstrasse 10
CH - 4009 Basel
Tel +41 61 306 14 76
Fax +41 61 306 12 34
E-Mail permission@karger.ch

From: vincent wellemans [mailto:[REDACTED]]
Sent: Friday, January 12, 2007 9:01 PM
To: Rights and Permissions
Subject: Copyright permission

Dear editor

I'm a student in the Department of Medicine at the « Université de Montréal », Québec, Canada. Presently, I'm writing my thesis and I would like to insert a figure from one paper that you have previously published. The publication is

Murdoch, C., and A. Finn. 2000. Chemokine receptors and their role in vascular biology. *J Vasc Res.* 37:1-7.

I ask you the permission to insert this figure edited in your journal. Indeed, this figure is important for the comprehension of the introduction of my PhD thesis.

I hope you will see no inconvenience and you allow me to insert it into my PhD thesis introductions.

Regards

Vincent wellemans

Université de Montréal
[REDACTED]

Découvrez une nouvelle façon d'obtenir des réponses à toutes vos questions ! Profitez des connaissances, des opinions et des expériences des internautes sur [Yahoo! Questions/Réponses](#).

Découvrez une nouvelle façon d'obtenir des réponses à toutes vos questions ! Profitez des connaissances, des opinions et des expériences des internautes sur [Yahoo! Questions/Réponses](#).

BIBLIOGRAPHIE

- Adachi, T., R. Vita, S. Sannohe, S. Stafford, R. Alam, H. Kayaba, and J. Chihara. 2001. The functional role of rho and rho-associated coiled-coil forming protein kinase in eotaxin signaling of eosinophils. *J Immunol.* 167:4609-15.
- Aherne, W., T. Bird, S.D. Court, P.S. Gardner, and J. McQuillin. 1970. Pathological changes in virus infections of the lower respiratory tract in children. *J Clin Pathol.* 23:7-18.
- Alam, R., S. Stafford, P. Forsythe, R. Harrison, D. Faubion, M.A. Lett-Brown, and J.A. Grant. 1993. RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. *J Immunol.* 150:3442-8.
- Albini, A., S. Ferrini, R. Benelli, S. Sforzini, D. Giunciuglio, M.G. Aluigi, A.E. Proudfoot, S. Alouani, T.N. Wells, G. Mariani, R.L. Rabin, J.M. Farber, and D.M. Noonan. 1998. HIV-1 Tat protein mimicry of chemokines. *Proc Natl Acad Sci US A.* 95:13153-8.
- Alcami, A. 2003. Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors. *Nat Rev Immunol.* 3:36-50.
- Altmeyer, R. 2004. Virus attachment and entry offer numerous targets for antiviral therapy. *Curr Pharm Des.* 10:3701-12.
- Alwan, W.H., W.J. Kozłowska, and P.J. Openshaw. 1994. Distinct types of lung disease caused by functional subsets of antiviral T cells. *J Exp Med.* 179:81-9.
- Alwan, W.H., and P.J. Openshaw. 1993. Distinct patterns of T- and B-cell immunity to respiratory syncytial virus induced by individual viral proteins. *Vaccine.* 11:431-7.
- Alwan, W.H., F.M. Record, and P.J. Openshaw. 1992. CD4+ T cells clear virus but augment disease in mice infected with respiratory syncytial virus. Comparison with the effects of CD8+ T cells. *Clin Exp Immunol.* 88:527-36.
- Annunziato, F., L. Cosmi, G. Galli, C. Beltrame, P. Romagnani, R. Manetti, S. Romagnani, and E. Maggi. 1999. Assessment of chemokine receptor expression by human Th1 and Th2 cells in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol.* 65:691-9.
- Arnold, R., B. König, H. Werchau, and W. König. 2004. Respiratory syncytial virus deficient in soluble G protein induced an increased proinflammatory response in human lung epithelial cells. *Virology.* 330:384-97.
- Asensio, V.C., S. Lassmann, A. Pagenstecher, S.C. Steffensen, S.J. Henriksen, and I.L. Campbell. 1999. C10 is a novel chemokine expressed in experimental inflammatory demyelinating disorders that promotes recruitment of macrophages to the central nervous system. *Am J Pathol.* 154:1181-91.
- Badr, G., G. Borhis, D. Treton, C. Moog, O. Garraud, and Y. Richard. 2005. HIV type 1 glycoprotein 120 inhibits human B cell chemotaxis to CXC chemokine ligand (CXCL) 12, CC chemokine ligand (CCL)20, and CCL21. *J Immunol.* 175:302-10.
- Baker, A.H., D.R. Edwards, and G. Murphy. 2002. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci.* 115:3719-27.
- Balabanian, K., J. Harriague, C. Decrion, B. Lagane, S. Shorte, F. Baleux, J.L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, and L.A. Chakrabarti. 2004. CXCR4-tropic HIV-1 envelope glycoprotein functions as a viral chemokine in unstimulated primary CD4+ T lymphocytes. *J Immunol.* 173:7150-60.
- Baldwin, J.M. 1993. The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *Embo J.* 12:1693-703.
- Barnwell, J.W., M.E. Nichols, and P. Rubinstein. 1989. In vitro evaluation of the role of the Duffy blood group in erythrocyte invasion by *Plasmodium vivax*. *J Exp Med.* 169:1795-802.
- Bartholdy, C., W. Olszewska, A. Stryhn, A.R. Thomsen, and P.J. Openshaw. 2004. Gene-gun DNA vaccination aggravates respiratory syncytial virus-induced pneumonitis. *J Gen Virol.* 85:3017-26.
- Becker, S., J. Quay, and J. Soukup. 1991. Cytokine (tumor necrosis factor, IL-6, and IL-8) production by respiratory syncytial virus-infected human alveolar macrophages. *J Immunol.* 147:4307-12.
- Becker, S., and J.M. Soukup. 1999. Airway epithelial cell-induced activation of monocytes and eosinophils in respiratory syncytial viral infection. *Immunobiology.* 201:88-106.
- Bembridge, G.P., R. Garcia-Beato, J.A. Lopez, J.A. Melero, and G. Taylor. 1998. Subcellular site of expression and route of vaccination influence pulmonary eosinophilia following respiratory syncytial virus challenge in BALB/c mice sensitized to the attachment G protein. *J Immunol.* 161:2473-80.
- Bembridge, G.P., N. Rodriguez, R. Garcia-Beato, C. Nicolson, J.A. Melero, and G. Taylor. 2000a. DNA encoding the attachment (G) or fusion (F) protein of respiratory syncytial virus induces protection in the absence of pulmonary inflammation. *J Gen Virol.* 81:2519-23.

- Bembridge, G.P., N. Rodriguez, R. Garcia-Beato, C. Nicolson, J.A. Melero, and G. Taylor. 2000b. Respiratory syncytial virus infection of gene gun vaccinated mice induces Th2-driven pulmonary eosinophilia even in the absence of sensitisation to the fusion (F) or attachment (G) protein. *Vaccine*. 19:1038-46.
- Benelli, R., A. Barbero, S. Ferrini, P. Scapini, M. Cassatella, F. Bussolino, C. Tacchetti, D.M. Noonan, and A. Albini. 2000. Human immunodeficiency virus transactivator protein (Tat) stimulates chemotaxis, calcium mobilization, and activation of human polymorphonuclear leukocytes: implications for Tat-mediated pathogenesis. *J Infect Dis*. 182:1643-51.
- Berger, E.A. 1997. HIV entry and tropism: the chemokine receptor connection. *Aids*. 11 Suppl A:S3-16.
- Biron, C.A., K.B. Nguyen, G.C. Pien, L.P. Cousens, and T.P. Salazar-Mather. 1999. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol*. 17:189-220.
- Biti, R., R. Ffrench, J. Young, B. Bennets, G. Stewart, and T. Liang. 1997. HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 deletion allele. *Nat Med*. 3:252-3.
- Black, C.P. 2003. Systematic review of the biology and medical management of respiratory syncytial virus infection. *Respir Care*. 48:209-31; discussion 231-3.
- Blanco, J.C., J.Y. Richardson, M.E. Darnell, A. Rowzee, L. Pletneva, D.D. Porter, and G.A. Prince. 2002. Cytokine and chemokine gene expression after primary and secondary respiratory syncytial virus infection in cotton rats. *J Infect Dis*. 185:1780-5.
- Blyth, D.I., M.S. Pedrick, T.J. Savage, H. Bright, J.E. Beesley, and S. Sanjar. 1998. Induction, duration, and resolution of airway goblet cell hyperplasia in a murine model of atopic asthma: effect of concurrent infection with respiratory syncytial virus and response to dexamethasone. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 19:38-54.
- Borish, L.C., and J.W. Steinke. 2003. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol*. 111:S460-75.
- Brandenburg, A.H., H.J. Neijens, and A.D. Osterhaus. 2001. Pathogenesis of RSV lower respiratory tract infection: implications for vaccine development. *Vaccine*. 19:2769-82.
- Bright, H., T. Turnbull, G.L. Toms, and R. Scott. 1995. Comparison of the T helper cell response induced by respiratory syncytial virus and its fusion protein in BALB/c mice. *Vaccine*. 13:915-22.
- Brinckerhoff, C.E., and L.M. Matrisian. 2002. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3:207-14.
- Brostjan, C., J. Anrather, V. Cszimadia, D. Stroka, M. Soares, F.H. Bach, H. Winkler. 1996. Glucocorticoid-mediated repression of NFkappaB activity in endothelial cells does not involve induction of IkappaBalpha synthesis. *J Biol Chem*; 271: 19612-6.
- Buckingham, S.C., H.S. Jafri, A.J. Bush, C.M. Carubelli, P. Sheeran, R.D. Hardy, M.G. Ottolini, O. Ramilo, and J.P. DeVincenzo. 2002. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of dexamethasone in severe respiratory syncytial virus (RSV) infection: effects on RSV quantity and clinical outcome. *J Infect Dis*. 185:1222-8.
- Burgel, P.R., and J.A. Nadel. 2004. Roles of epidermal growth factor receptor activation in epithelial cell repair and mucin production in airway epithelium. *Thorax*. 59:992-6.
- Burke, B. 2004. The role of matrix metalloproteinase 7 in innate immunity. *Immunobiology*. 209:51-6.
- Burrage, P.S., K.S. Mix, and C.E. Brinckerhoff. 2006. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci*. 11:529-43.
- Cade, A., K.G. Brownlee, S.P. Conway, D. Haigh, A. Short, J. Brown, D. Dassu, S.A. Mason, A. Phillips, R. Eglin, M. Graham, A. Chetcuti, M. Chatrath, N. Hudson, A. Thomas, and P.A. Chetcuti. 2000. Randomised placebo controlled trial of nebulised corticosteroids in acute respiratory syncytial viral bronchiolitis. *Arch Dis Child*. 82:126-30.
- Castedo, M., J.L. Perfettini, K. Andreau, T. Roumier, M. Piacentini, and G. Kroemer. 2003. Mitochondrial apoptosis induced by the HIV-1 envelope. *Ann NY Acad Sci*. 1010:19-28.
- Cataldo, D.D., M.M. Gueders, N. Rocks, N.E. Sounni, B. Evrard, P. Bartsch, R. Louis, A. Noel, and J.M. Foidart. 2003. Pathogenic role of matrix metalloproteases and their inhibitors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease and therapeutic relevance of matrix metalloproteases inhibitors. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 49:875-84.
- Caulfield, J., M. Fernandez, V. Snetkov, T. Lee, and C. Hawrylowicz. 2002. CXCR4 expression on monocytes is up-regulated by dexamethasone and is modulated by autologous CD3+ T cells. *Immunology*. 105:155-62.

- Chanock, R., and L. Finberg. 1957. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiologic aspects of infection in infants and young children. *Am J Hyg.* 66:291-300.
- Chaudhuri, A., V. Zbrzezna, J. Polyakova, A.O. Pogo, J. Hesselgesser, and R. Horuk. 1994. Expression of the Duffy antigen in K562 cells. Evidence that it is the human erythrocyte chemokine receptor. *J Biol Chem.* 269:7835-8.
- Chen, S., K.B. Bacon, L. Li, G.E. Garcia, Y. Xia, D. Lo, D.A. Thompson, M.A. Siani, T. Yamamoto, J.K. Harrison, and L. Feng. 1998. In vivo inhibition of CC and CX3C chemokine-induced leukocyte infiltration and attenuation of glomerulonephritis in Wistar-Kyoto (WKY) rats by vMIP-II. *J Exp Med.* 188:193-8.
- Cho, S.H., C.H. Ryu, and C.K. Oh. 2004. Plasminogen activator inhibitor-1 in the pathogenesis of asthma. *Exp Biol Med (Maywood).* 229:138-46.
- Choe, H., M. Farzan, M. Konkel, K. Martin, Y. Sun, L. Marcon, M. Cayabyab, M. Berman, M.E. Dorf, N. Gerard, C. Gerard, and J. Sodroski. 1998. The orphan seven-transmembrane receptor apj supports the entry of primary T-cell-line-tropic and dualtropic human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 72:6113-8.
- Cole, K.E., C.A. Strick, T.J. Paradis, K.T. Ogborne, M. Loetscher, R.P. Gladue, W. Lin, J.G. Boyd, B. Moser, D.E. Wood, B.G. Sahagan, and K. Neote. 1998. Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J Exp Med.* 187:2009-21.
- Collins, P.L. 1990. O glycosylation of glycoprotein G of human respiratory syncytial virus is specified within the divergent ectodomain. *J Virol.* 64:4007-12.
- Collins, P.L., M.G. Hill, E. Camargo, H. Grosfeld, R.M. Chanock, and B.R. Murphy. 1995. Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:11563-7.
- Collins, P.L., M.G. Hill, J. Cristina, and H. Grosfeld. 1996. Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:81-5.
- Combadiere, C., J. Gao, H.L. Tiffany, and P.M. Murphy. 1998a. Gene cloning, RNA distribution, and functional expression of mCX3CR1, a mouse chemotactic receptor for the CX3C chemokine fractalkine. *Biochem Biophys Res Commun.* 253:728-32.
- Combadiere, C., K. Salzwedel, E.D. Smith, H.L. Tiffany, E.A. Berger, and P.M. Murphy. 1998b. Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1. *J Biol Chem.* 273:23799-804.
- Connors, M., N.A. Giese, A.B. Kulkarni, C.Y. Firestone, H.C. Morse, 3rd, and B.R. Murphy. 1994. Enhanced pulmonary histopathology induced by respiratory syncytial virus (RSV) challenge of formalin-inactivated RSV-immunized BALB/c mice is abrogated by depletion of interleukin-4 (IL-4) and IL-10. *J Virol.* 68:5321-5.
- Connors, M., A.B. Kulkarni, C.Y. Firestone, K.L. Holmes, H.C. Morse, 3rd, A.V. Sotnikov, and B.R. Murphy. 1992. Pulmonary histopathology induced by respiratory syncytial virus (RSV) challenge of formalin-inactivated RSV-immunized BALB/c mice is abrogated by depletion of CD4+ T cells. *J Virol.* 66:7444-51.
- Crisi, G.M., I.R. Katz, M.B. Zucker, and G.J. Thorbecke. 1996. Induction of inhibitory activity for B cell differentiation in human CD8 T cells with pokeweed mitogen, dimaprit, and cAMP upregulating agents: countersuppressive effect of platelet factor 4. *Cell Immunol.* 172:205-16.
- Crowley, S. 2003. Inhaled glucocorticoids and adrenal function: an update. *Paediatr Respir Rev.* Jun;4(2):153-61.
- Dabbagh, K., Y. Xiao, C. Smith, P. Stepick-Biek, S.G. Kim, W.J. Lamm, D.H. Liggitt, and D.B. Lewis. 2000. Local blockade of allergic airway hyperreactivity and inflammation by the poxvirus-derived pan-CC-chemokine inhibitor vCCI. *J Immunol.* 165:3418-22.
- Das, S., M. Mandal, T. Chakraborti, A. Mandal, and S. Chakraborti. 2003. Structure and evolutionary aspects of matrix metalloproteinases: A brief overview. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 253:31-40.
- Davis, C.N., V. Zujovic, and J.K. Harrison. 2004. Viral macrophage inflammatory protein-II and fractalkine (CX3CL1) chimeras identify molecular determinants of affinity, efficacy, and selectivity at CX3CR1. *Mol Pharmacol.* 66:1431-9.

- de Paulis, A., R. De Palma, L. Di Gioia, M. Carfora, N. Prevete, G. Tosi, R.S. Accolla, and G. Marone. 2000. Tat protein is an HIV-1-encoded beta-chemokine homolog that promotes migration and up-regulates CCR3 expression on human Fc epsilon RI+ cells. *J Immunol.* 165:7171-9.
- Doranz, B.J., M.J. Orsini, J.D. Turner, T.L. Hoffman, J.F. Berson, J.A. Hoxie, S.C. Peiper, L.F. Brass, and R.W. Doms. 1999. Identification of CXCR4 domains that support coreceptor and chemokine receptor functions. *J Virol.* 73:2752-61.
- Doranz, B.J., J. Rucker, Y. Yi, R.J. Smyth, M. Samson, S.C. Peiper, M. Parmentier, R.G. Collman, and R.W. Doms. 1996. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell.* 85:1149-58.
- Dorscheid, D.R., K.R. Wojcik, K. Yule, S.R. White. 2001. Role of cell surface glycosylation in mediating repair of human airway epithelial cell monolayers. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* Oct;281(4):L982-92.
- Dorscheid, D.R., E. Low, A. Conforti, S. Shifrin, A.I. Sperling. 2003. White SR. Corticosteroid-induced apoptosis in mouse airway epithelium: effect in normal airways and after allergen-induced airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* Feb;111(2):360-6.
- Dorscheid, D.R., B.J. Patchell, O. Estrada, B. Marroquin, R. Tse, S.R. White. 2006. Effects of corticosteroid-induced apoptosis on airway epithelial wound closure in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* Oct;291(4):L794-801.
- Dower, S.K. 2000. Cytokines, virokines and the evolution of immunity. *Nat Immunol.* 1:367-8.
- Dunsmore, S.E., U.K. Saarialho-Kere, J.D. Roby, C.L. Wilson, L.M. Matrisian, H.G. Welgus, and W.C. Parks. 1998. Matrilysin expression and function in airway epithelium. *J Clin Invest.* 102:1321-31.
- Egeblad, M., and Z. Werb. 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2:161-74.
- Elias, J.A., C.G. Lee, T. Zheng, B. Ma, R.J. Homer, and Z. Zhu. 2003. New insights into the pathogenesis of asthma. *J Clin Invest.* 111:291-7.
- Elliott, M.B., P.W. Tebbey, K.S. Pryharski, C.A. Scheuer, T.S. Laughlin, and G.E. Hancock. 2004. Inhibition of respiratory syncytial virus infection with the CC chemokine RANTES (CCL5). *J Med Virol.* 73:300-8.
- Elsner, J., Y. Dulkys, D. Kimmig, T.N. Wells, A.E. Proudfoot, and A. Kapp. 2001. Aminooxypentane-RANTES induces CCR3 activation and internalization of CCR3 from the surface of human eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol.* 124:227-9.
- Elsner, J., S.E. Escher, and U. Forssmann. 2004. Chemokine receptor antagonists: a novel therapeutic approach in allergic diseases. *Allergy.* 59:1243-58.
- Endres, M.J., C.G. Garlisi, H. Xiao, L. Shan, and J.A. Hedrick. 1999. The Kaposi's sarcoma-related herpesvirus (KSHV)-encoded chemokine vMIP-I is a specific agonist for the CC chemokine receptor (CCR)8. *J Exp Med.* 189:1993-8.
- Erb, K.J. 1999. Atopic disorders: a default pathway in the absence of infection? *Immunol Today.* 20:317-22.
- Esmailpour, N., P. Hogger, K.F. Rabe, U. Heitmann, M. Nakashima, P. Rohdewald. 1997. Distribution of inhaled fluticasone propionate between human lung tissue and serum in vivo. *Eur Respir J.* Jul;10(7):1496-9
- Fahy, J.V. 2002. Goblet cell and mucin gene abnormalities in asthma. *Chest.* 122:320S-326S.
- Falsey, A.R., and E.E. Walsh. 1996. Safety and immunogenicity of a respiratory syncytial virus subunit vaccine (PFP-2) in ambulatory adults over age 60. *Vaccine.* 14:1214-8.
- Falsey, A.R., and E.E. Walsh. 1997. Safety and immunogenicity of a respiratory syncytial virus subunit vaccine (PFP-2) in the institutionalized elderly. *Vaccine.* 15:1130-2.
- Feldman, S.A., R.M. Hendry, and J.A. Beeler. 1999. Identification of a linear heparin binding domain for human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G. *J Virol.* 73:6610-7.
- Fernandez, E.J., and E. Lolis. 2001. Structural studies of chemokines that inhibit HIV-1 entry. *Antivir Chem Chemother.* 12 Suppl 1:43-9.
- Fernandez, E.J., and E. Lolis. 2002. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 42:469-99.
- Fernie, B.F., G. Dapolito, P.J. Cote, Jr., and J.L. Gerin. 1985. Kinetics of synthesis of respiratory syncytial virus glycoproteins. *J Gen Virol.* 66 (Pt 9):1983-90.
- Fonseca Cde, B., and S. Grisi. 2003. Bronchiolitis, respiratory syncytial virus, and recurrent wheezing: what is the relationship? *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.* 58:39-48.

- Fujishima, H., Y. Okamoto, I. Saito, and K. Tsubota. 1995. Respiratory syncytial virus and allergic conjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol.* 95:663-7.
- Fukunaga, K., K. Asano, X.Q. Mao, P.S. Gao, M.H. Roberts, T. Oguma, T. Shiomi, M. Kanazawa, C.N. Adra, T. Shirakawa, J.M. Hopkin, and K. Yamaguchi. 2001. Genetic polymorphisms of CC chemokine receptor 3 in Japanese and British asthmatics. *Eur Respir J.* 17:59-63.
- Gangur, V., N.P. Birmingham, and S. Thanavorakul. 2002. Chemokines in health and disease. *Vet Immunol Immunopathol.* 86:127-36.
- Garofalo, R., J.L. Kimpen, R.C. Welliver, and P.L. Ogra. 1992. Eosinophil degranulation in the respiratory tract during naturally acquired respiratory syncytial virus infection. *J Pediatr.* 120:28-32.
- Garofalo, R.P., and H. Haeberle. 2000. Epithelial regulation of innate immunity to respiratory syncytial virus. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 23:581-5.
- Garrison, M.M., D.A. Christakis, E. Harvey, P. Cummings, and R.L. Davis. 2000. Systemic corticosteroids in infant bronchiolitis: A meta-analysis. *Pediatrics.* 105:E44.
- Gengrinovitch, S., S.M. Greenberg, T. Cohen, H. Gitay-Goren, P. Rockwell, T.E. Maione, B.Z. Levi, and G. Neufeld. 1995. Platelet factor-4 inhibits the mitogenic activity of VEGF121 and VEGF165 using several concurrent mechanisms. *J Biol Chem.* 270:15059-65.
- Gern, J.E. 2004. Viral respiratory infection and the link to asthma. *Pediatr Infect Dis J.* 23:S78-86.
- Glezen, W.P., L.H. Taber, A.L. Frank, and J.A. Kasel. 1986. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *Am J Dis Child.* 140:543-6.
- Golding, H., J. Aliberti, L.R. King, J. Manischewitz, J. Andersen, J. Valenzuela, N.R. Landau, and A. Sher. 2003. Inhibition of HIV-1 infection by a CCR5-binding cyclophilin from *Toxoplasma gondii*. *Blood.* 102:3280-6.
- Golding, H., S. Khurana, F. Yarovinsky, L.R. King, G. Abdoulaeva, L. Antonsson, C. Owman, E.J. Platt, D. Kabat, J.F. Andersen, and A. Sher. 2005. CCR5 N-terminal region plays a critical role in HIV-1 inhibition by *Toxoplasma gondii*-derived cyclophilin-18. *J Biol Chem.* 280:29570-7.
- Greenberg, H.B., and P.A. Piedra. 2004. Immunization against viral respiratory disease: a review. *Pediatr Infect Dis J.* 23:S254-61.
- Groothuis, J.R., C.K. Salbenblatt, and B.A. Lauer. 1990. Severe respiratory syncytial virus infection in older children. *Am J Dis Child.* 144:346-8.
- Gruber, C., and S. Levine. 1985. Respiratory syncytial virus polypeptides. V. The kinetics of glycoprotein synthesis. *J Gen Virol.* 66 (Pt 6):1241-7.
- Hacking, D., and J. Hull. 2002. Respiratory syncytial virus--viral biology and the host response. *J Infect.* 45:18-24.
- Hadley, T.J., and S.C. Peiper. 1997. From malaria to chemokine receptor: the emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen. *Blood.* 89:3077-91.
- Hall, C.B., R.G. Douglas, Jr., and J.M. Geiman. 1976. Respiratory syncytial virus infections in infants: quantitation and duration of shedding. *J Pediatr.* 89:11-5.
- Hall, C.B., R.G. Douglas, Jr., K.C. Schnabel, and J.M. Geiman. 1981. Infectivity of respiratory syncytial virus by various routes of inoculation. *Infect Immun.* 33:779-83.
- Hall, C.B., E.E. Walsh, C.E. Long, and K.C. Schnabel. 1991. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. *J Infect Dis.* 163:693-8.
- Hamid, Q., M. Azzawi, S. Ying, R. Moqbel, A.J. Wardlaw, C.J. Corrigan, B. Bradley, S.R. Durham, J.V. Collins, P.K. Jeffery, and et al. 1991. Expression of mRNA for interleukin-5 in mucosal bronchial biopsies from asthma. *J Clin Invest.* 87:1541-6.
- Hamm, H.E. 1998. The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem.* 273:669-72.
- Hancock, G.E., D.J. Speelman, K. Heers, E. Bortell, J. Smith, and C. Cosco. 1996. Generation of atypical pulmonary inflammatory responses in BALB/c mice after immunization with the native attachment (G) glycoprotein of respiratory syncytial virus. *J Virol.* 70:7783-91.
- Hansel, T.T., J. D. Pound, R. A. Thompson. 1990. Isolation of eosinophils from human blood. *J Immunol Methods.* 127(2):153-164
- Harcourt, J., R. Alvarez, L.P. Jones, C. Henderson, L.J. Anderson, R.A. Tripp. 2006. Respiratory syncytial virus G protein and G protein CX3C motif adversely affect CX3CR1+ T cell responses. *J Immunol.* Feb 1;176(3):1600-8 -
- Harris, J., and D. Werling. 2003. Binding and entry of respiratory syncytial virus into host cells and initiation of the innate immune response. *Cell Microbiol.* 5:671-80.

- Harrison, A.M., C.A. Bonville, H.F. Rosenberg, and J.B. Domachowske. 1999. Respiratory syncytial virus-induced chemokine expression in the lower airways: eosinophil recruitment and degranulation. *Am J Respir Crit Care Med.* 159:1918-24.
- Haynes, L.M., L.P. Jones, A. Barskey, L.J. Anderson, and R.A. Tripp. 2003. Enhanced disease and pulmonary eosinophilia associated with formalin-inactivated respiratory syncytial virus vaccination are linked to G glycoprotein CX3C-CX3CR1 interaction and expression of substance P. *J Virol.* 77:9831-44.
- Haynes, L.M., D.D. Moore, E.A. Kurt-Jones, R.W. Finberg, L.J. Anderson, and R.A. Tripp. 2001. Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. *J Virol.* 75:10730-7.
- He, J., Y. Chen, M. Farzan, H. Choe, A. Ohagen, S. Gartner, J. Busciglio, X. Yang, W. Hofmann, W. Newman, C.R. Mackay, J. Sodroski, and D. Gabuzda. 1997. CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. *Nature.* 385:645-9.
- Hedrick, J.A., and A. Zlotnik. 1998. Lymphotactin. *Clin Immunol Immunopathol.* 87:218-22.
- Hendricks, D.A., K. McIntosh, and J.L. Patterson. 1988. Further characterization of the soluble form of the G glycoprotein of respiratory syncytial virus. *J Virol.* 62:2228-33.
- Hendry, R.M., A.L. Talis, E. Godfrey, L.J. Anderson, B.F. Fernie, K. McIntosh. 1986. Concurrent circulation of antigenically distinct strains of respiratory syncytial virus during community outbreaks. *J Infect Dis.* 153(2):291-270.
- Hendry, R. M., L.T. Pierik, K. McIntosh. 1989. Prevalence of respiratory syncytial virus subgroups over six consecutive outbreaks: 1981-1987. *J Infect Dis.* 160(2):185-190.
- Hermans, E. 2003. Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther.* 99:25-44.
- Heveker, N. 2001. Chemokine receptors as anti-retroviral targets. *Curr Drug Targets.* 2:21-39.
- Hogaboam, C.M., C.S. Gallinat, D.D. Taub, R.M. Strieter, S.L. Kunkel, and N.W. Lukacs. 1999. Immunomodulatory role of C10 chemokine in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Immunol.* 162:6071-9.
- Holmskov, U., R. Malhotra, R.B. Sim, and J.C. Jensenius. 1994. Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. *Immunol Today.* 15:67-74.
- Holst, P.J., H.R. Luttichau, T.W. Schwartz, and M.M. Rosenkilde. 2003. Virally encoded chemokines and chemokine receptors in the role of viral infections. *Contrib Microbiol.* 10:232-52.
- Holst, P.J., and M.M. Rosenkilde. 2003. Microbiological exploitation of the chemokine system. *Microbes Infect.* 5:179-87.
- Holt, P.G., and P.D. Sly. 2002. Interactions between RSV infection, asthma, and atopy: unraveling the complexities. *J Exp Med.* 196:1271-5.
- Holtzman, M.J., J.D. Morton, L.P. Shornick, J.W. Tyner, M.P. O'Sullivan, A. Antao, M. Lo, M. Castro, and M.J. Walter. 2002. Immunity, inflammation, and remodeling in the airway epithelial barrier: epithelial-viral-allergic paradigm. *Physiol Rev.* 82:19-46.
- Homma, T., A. Kato, N. Hashimoto, J. Batchelor, M. Yoshikawa, S. Imai, H. Wakiguchi, H. Saito, and K. Matsumoto. 2004. Corticosteroid and cytokines synergistically enhance toll-like receptor 2 expression in respiratory epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 31:463-9.
- Horuk, R., C.E. Chitnis, W.C. Darbonne, T.J. Colby, A. Rybicki, T.J. Hadley, and L.H. Miller. 1993a. A receptor for the malarial parasite Plasmodium vivax: the erythrocyte chemokine receptor. *Science.* 261:1182-4.
- Horuk, R., T.J. Colby, W.C. Darbonne, T.J. Schall, and K. Neote. 1993b. The human erythrocyte inflammatory peptide (chemokine) receptor. Biochemical characterization, solubilization, and development of a binding assay for the soluble receptor. *Biochemistry.* 32:5733-8.
- Horuk, R., J. Hesselgesser, Y. Zhou, D. Faulds, M. Halks-Miller, S. Harvey, D. Taub, M. Samson, M. Parmentier, J. Rucker, B.J. Doranz, and R.W. Doms. 1998. The CC chemokine I-309 inhibits CCR8-dependent infection by diverse HIV-1 strains. *J Biol Chem.* 273:386-91.
- Huang, Y.T., P.L. Collins, and G.W. Wertz. 1985. Characterization of the 10 proteins of human respiratory syncytial virus: identification of a fourth envelope-associated protein. *Virus Res.* 2:157-73.
- Huang, Y.T., and G.W. Wertz. 1982. The genome of respiratory syncytial virus is a negative-stranded RNA that codes for at least seven mRNA species. *J Virol.* 43:150-7.

- Hubner, R.H., S. Meffert, U. Mundt, H. Bottcher, S. Freitag, N.E. El Mokhtari, T. Pufe, S. Hirt, U.R. Folsch, and B. Bewig. 2005. Matrix metalloproteinase-9 in bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Eur Respir J*. 25:494-501.
- Hull, J., K. Rowlands, E. Lockhart, C. Moore, M. Sharland, and D. Kwiatkowski. 2003. Variants of the chemokine receptor CCR5 are associated with severe bronchiolitis caused by respiratory syncytial virus. *J Infect Dis*. 188:904-7.
- Humbles, A.A., B. Lu, D.S. Friend, S. Okinaga, J. Lora, A. Al-Garawi, T.R. Martin, N.P. Gerard, and C. Gerard. 2002. The murine CCR3 receptor regulates both the role of eosinophils and mast cells in allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:1479-84.
- Hussell, T., and P.J. Openshaw. 1996. Immunological determinants of disease caused by respiratory syncytial virus. *Trends Microbiol*. 4:299-300.
- Hussell, T., and P.J. Openshaw. 1998. Intracellular IFN-gamma expression in natural killer cells precedes lung CD8+ T cell recruitment during respiratory syncytial virus infection. *J Gen Virol*. 79 (Pt 11):2593-601.
- Iyengar, S., D.H. Schwartz, and J.E. Hildreth. 1999. T cell-tropic HIV gp120 mediates CD4 and CD8 cell chemotaxis through CXCR4 independent of CD4: implications for HIV pathogenesis. *J Immunol*. 162:6263-7.
- Jaffuel, D., P. Demoly, C. Gougat, P. Balaguer, G. Mautino, P. Godard, J. Bousquet, M. Mathieu. 2000. Transcriptional potencies of inhaled glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med*. Jul;162(1):57-63.
- Jaovisidha, P., M.E. Peeples, A.A. Brees, L.R. Carpenter, and J.N. Moy. 1999. Respiratory syncytial virus stimulates neutrophil degranulation and chemokine release. *J Immunol*. 163:2816-20.
- Jeng, M.J., and R.J. Lemen. 1997. Respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Am Fam Physician*. 55:1139-46, 1149-50.
- John, A., and G. Tuszyński. 2001. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol Oncol Res*. 7:14-23.
- John, A.E., C.J. Gerard, M. Schaller, A.L. Miller, A.A. Berlin, A.A. Humbles, and N.W. Lukacs. 2005. Respiratory syncytial virus-induced exaggeration of allergic airway disease is dependent upon CCR1-associated immune responses. *Eur J Immunol*. 35:108-16.
- Johnson, K.M., R.M. Chanock, D. Rifkind, H.M. Kravetz, and V. Knight. 1961. Respiratory syncytial virus. IV. Correlation of virus shedding, serologic response, and illness in adult volunteers. *JAMA*. May 27;176:663-7.
- Johnson, P.R., M.K. Spriggs, R.A. Olmsted, and P.L. Collins. 1987. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84:5625-9.
- Johnson, T.R., and B.S. Graham. 1999. Secreted respiratory syncytial virus G glycoprotein induces interleukin-5 (IL-5), IL-13, and eosinophilia by an IL-4-independent mechanism. *J Virol*. 73:8485-95.
- Johnson, T.R., J.E. Johnson, S.R. Roberts, G.W. Wertz, R.A. Parker, and B.S. Graham. 1998. Priming with secreted glycoprotein G of respiratory syncytial virus (RSV) augments interleukin-5 production and tissue eosinophilia after RSV challenge. *J Virol*. 72:2871-80.
- Johnson, Z., A.E. Proudfoot, and T.M. Handel. 2005. Interaction of chemokines and glycosaminoglycans: a new twist in the regulation of chemokine function with opportunities for therapeutic intervention. *Cytokine Growth Factor Rev*. 16:625-36.
- Johnston, J.B., Y. Jiang, G. van Marle, M.B. Mayne, W. Ni, J. Holden, J.C. McArthur, and C. Power. 2000. Lentivirus infection in the brain induces matrix metalloproteinase expression: role of envelope diversity. *J Virol*. 74:7211-20.
- Kagnoff, M.F., and L. Eckmann. 1997. Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J Clin Invest*. 100:6-10.
- Kameyoshi, Y., A. Dorschner, A.I. Mallet, E. Christophers, and J.M. Schroder. 1992. Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. *J Exp Med*. 176:587-92.
- Kampen, G.T., S. Stafford, T. Adachi, T. Jinqun, S. Quan, J.A. Grant, P.S. Skov, L.K. Poulsen, and R. Alam. 2000. Eotaxin induces degranulation and chemotaxis of eosinophils through the activation of ERK2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *Blood*. 95:1911-7.

- Kanbara, K., N. Fujii, and H. Nakashima. 2000. [A study of anti-HIV compounds which interfere the virus entry via coreceptor CXCR4]. *Kansenshogaku Zasshi*. 74:237-44.
- Kapikian, A.Z., R.H. Mitchell, R.M. Chanock, R.A. Shvedoff, and C.E. Stewart. 1969. An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine. *Am J Epidemiol*. 89:405-21.
- Karron, R.A., D.A. Buonagurio, A.F. Georgiu, S.S. Whitehead, J.E. Adamus, M.L. Clements-Mann, D.O. Harris, V.B. Randolph, S.A. Udem, B.R. Murphy, and M.S. Sidhu. 1997. Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94:13961-6.
- Karron, R.A., P.F. Wright, R.B. Belshe, B. Thumar, R. Casey, F. Newman, F.P. Polack, V.B. Randolph, A. Deatly, J. Hackell, W. Gruber, B.R. Murphy, and P.L. Collins. 2005. Identification of a recombinant live attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidate that is highly attenuated in infants. *J Infect Dis*. 191:1093-104.
- Kelly, E.A., and N.N. Jarjour. 2003. Role of matrix metalloproteinases in asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 9:28-33.
- Kelner, G.S., J. Kennedy, K.B. Bacon, S. Kleyensteuber, D.A. Largaespada, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, J.F. Bazan, K.W. Moore, T.J. Schall, and et al. 1994. Lymphotoxin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science*. 266:1395-9.
- Khandaker, M.H., G. Mitchell, L. Xu, J.D. Andrews, R. Singh, H. Leung, J. Madrenas, S.S. Ferguson, R.D. Feldman, and D.J. Kelvin. 1999. Metalloproteinases are involved in lipopolysaccharide- and tumor necrosis factor-alpha-mediated regulation of CXCR1 and CXCR2 chemokine receptor expression. *Blood*. 93:2173-85.
- Kim, H.W., J.G. Canchola, C.D. Brandt, G. Pyles, R.M. Chanock, K. Jensen, and R.H. Parrott. 1969. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol*. 89:422-34.
- Kim, W.D. 1997. Lung mucus: a clinician's view. *Eur Respir J*. 10:1914-7.
- Kimpen, J.L. 2001. Respiratory syncytial virus and asthma. The role of monocytes. *Am J Respir Crit Care Med*. 163:S7-9.
- Kips, J.C. 2001. Cytokines in asthma. *Eur Respir J Suppl*. 34:24s-33s.
- Klasse, P.J., and J.P. Moore. 2004. Is there enough gp120 in the body fluids of HIV-1-infected individuals to have biologically significant effects? *Virology*. 323:1-8.
- Kledal, T.N., M.M. Rosenkilde, F. Coulin, G. Simmons, A.H. Johnsen, S. Alouani, C.A. Power, H.R. Lutichau, J. Gerstoft, P.R. Clapham, I. Clark-Lewis, T.N. Wells, and T.W. Schwartz. 1997. A broad-spectrum chemokine antagonist encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Science*. 277:1656-9.
- Kofler, R., S. Schmidt, A. Kofler, M.J. Ausserlechner. 2003. Resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in lymphoblastic leukemia. *J Endocrinol*. Jul;178(1):19-27.
- Konig, B., H.J. Streckert, T. Krusat, and W. Konig. 1996. Respiratory syncytial virus G-protein modulates cytokine release from human peripheral blood mononuclear cells. *J Leukoc Biol*. 59:403-6.
- Korfhagen, T.R., and J.A. Whitsett. 1997. Transcriptional control in the developing lung. The Parker B. Francis lectureship. *Chest*. 111:83S-88S.
- Kunkel, E.B., EC. 2002. Chemokines and tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity*. 16:1-4.
- Kurt-Jones, E.A., L. Popova, L. Kwinn, L.M. Haynes, L.P. Jones, R.A. Tripp, E.E. Walsh, M.W. Freeman, D.T. Golenbock, L.J. Anderson, and R.W. Finberg. 2000. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol*. 1:398-401.
- Lai, J.P., W.Z. Ho, J.H. Yang, X. Wang, L. Song, and S.D. Douglas. 2002. A non-peptide substance P antagonist down-regulates SP mRNA expression in human mononuclear phagocytes. *J Neuroimmunol*. 128:101-8.
- Laing, K.J., and C.J. Secombes. 2004. Chemokines. *Dev Comp Immunol*. 28:443-60.
- Langedijk, J.P., W.M. Schaaper, R.H. Melen, and J.T. van Oirschot. 1996. Proposed three-dimensional model for the attachment protein G of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol*. 77 (Pt 6):1249-57.
- Langley, J. 1994. Economic evaluation of hospitalized Canadian children with Respiratory Syncytial Virus (RSV) infection. *Annual meeting of the RCPS*. Toronto, Ontario.
- Larsen, C.G., A.O. Anderson, E. Appella, J.J. Oppenheim, and K. Matsushima. 1989. The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science*. 243:1464-6.

- Lee, B., M. Sharron, C. Blanpain, B.J. Doranz, J. Vakili, P. Setoh, E. Berg, G. Liu, H.R. Guy, S.R. Durell, M. Parmentier, C.N. Chang, K. Price, M. Tsang, and R.W. Doms. 1999. Epitope mapping of CCR5 reveals multiple conformational states and distinct but overlapping structures involved in chemokine and coreceptor function. *J Biol Chem.* 274:9617-26.
- Legg, J.P., I. R. Hussain, J. A. Warner, S. L. Johnston, J. O. Warner. 2003. Type 1 and type 2 cytokine imbalance in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 168(6):633-639.
- Lemanske, R.F., Jr. 2002. The childhood origins of asthma (COAST) study. *Pediatr Allergy Immunol.* 13 Suppl 15:38-43.
- Lemanske, R.F., Jr., and W.W. Busse. 2003. 6. Asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 111:S502-19.
- Lerch, R.A., K. Anderson, and G.W. Wertz. 1990. Nucleotide sequence analysis and expression from recombinant vectors demonstrate that the attachment protein G of bovine respiratory syncytial virus is distinct from that of human respiratory syncytial virus. *J Virol.* 64:5559-69.
- Levine, S., R. Klaiber-Franco, and P.R. Paradiso. 1987. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol.* 68 (Pt 9):2521-4.
- Li, X., S. Sambhara, C.X. Li, L. Ettore, I. Switzer, G. Cates, O. James, M. Parrington, R. Oomen, R.P. Du, and M. Klein. 2000. Plasmid DNA encoding the respiratory syncytial virus G protein is a promising vaccine candidate. *Virology.* 269:54-65.
- Li, X., S. Sambhara, C.X. Li, M. Ewasyshyn, M. Parrington, J. Caterini, O. James, G. Cates, R.P. Du, and M. Klein. 1998. Protection against respiratory syncytial virus infection by DNA immunization. *J Exp Med.* 188:681-8.
- Lichtenstein, D.L., S.R. Roberts, G.W. Wertz, and L.A. Ball. 1996. Definition and functional analysis of the signal/anchor domain of the human respiratory syncytial virus glycoprotein G. *J Gen Virol.* 77 (Pt 1):109-18.
- Lin, C.L., A.K. Sewell, G.F. Gao, K.T. Whelan, R.E. Phillips, and J.M. Austyn. 2000. Macrophage-tropic HIV induces and exploits dendritic cell chemotaxis. *J Exp Med.* 192:587-94.
- Liu, Q.H., D.A. Williams, C. McManus, F. Baribaud, R.W. Doms, D. Schols, E. De Clercq, M.I. Kotlikoff, R.G. Collman, and B.D. Freedman. 2000. HIV-1 gp120 and chemokines activate ion channels in primary macrophages through CCR5 and CXCR4 stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:4832-7.
- Liu, R., W.A. Paxton, S. Choe, D. Ceradini, S.R. Martin, R. Horuk, M.E. MacDonald, H. Stuhlmann, R.A. Koup, and N.R. Landau. 1996. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell.* 86:367-77.
- Loetscher, P., A. Pellegrino, J.H. Gong, I. Mattioli, M. Loetscher, G. Bardi, M. Baggiolini, and I. Clark-Lewis. 2001. The ligands of CXC chemokine receptor 3, I-TAC, Mig, and IP10, are natural antagonists for CCR3. *J Biol Chem.* 276:2986-91.
- Lopez-Boado, Y.S., C.L. Wilson, and W.C. Parks. 2001. Regulation of matrilysin expression in airway epithelial cells by *Pseudomonas aeruginosa* flagellin. *J Biol Chem.* 276:41417-23.
- Louahed, J., S. Struyf, J.B. Demoulin, M. Parmentier, J. Van Snick, J. Van Damme, and J.C. Renaud. 2003. CCR8-dependent activation of the RAS/MAPK pathway mediates anti-apoptotic activity of I-309/CCL1 and vMIP-I. *Eur J Immunol.* 33:494-501.
- Luster, A.D., and M.E. Rothenberg. 1997. Role of the monocyte chemoattractant protein and eotaxin subfamily of chemokines in allergic inflammation. *J Leukoc Biol.* 62:620-33.
- Luttichau, H.R., I.C. Lewis, J. Gerstoft, and T.W. Schwartz. 2001. The herpesvirus 8-encoded chemokine vMIP-II, but not the poxvirus-encoded chemokine MC148, inhibits the CCR10 receptor. *Eur J Immunol.* 31:1217-20.
- Luttichau, H.R., J. Stine, T.P. Boesen, A.H. Johnsen, D. Chantry, J. Gerstoft, and T.W. Schwartz. 2000. A highly selective CC chemokine receptor (CCR)8 antagonist encoded by the poxvirus molluscum contagiosum. *J Exp Med.* 191:171-80.
- Ma, W., P.J. Bryce, A.A. Humbles, D. Laouini, A. Yalcindag, H. Alenius, D.S. Friend, H.C. Oettgen, C. Gerard, and R.S. Geha. 2002. CCR3 is essential for skin eosinophilia and airway hyperresponsiveness in a murine model of allergic skin inflammation. *J Clin Invest.* 109:621-8.
- Mackay, C.R. 2001. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol.* 2:95-101.
- Maggon, K., and S. Barik. 2004. New drugs and treatment for respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol.* 14:149-68.
- Mallia, P., and S.L. Johnston. 2002. Respiratory viruses: do they protect from or induce asthma? *Allergy.* 57:1118-29.

- Marquez, G.M., A.C. 2001. Chemokines: the times they are a-changin. *J. Clin. Invest.* 7:791-2.
- Masoli, M., D. Fabian, S. Holt, and R. Beasley. 2004. Global Burden of Asthma. 122.
- Massova, I., L.P. Kotra, R. Fridman, and S. Mobashery. 1998. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *Faseb J.* 12:1075-95.
- Matthews, S.P., J.S. Tregoning, A.J. Coyle, T. Hussell, and P.J. Openshaw. 2005. Role of CCL11 in eosinophilic lung disease during respiratory syncytial virus infection. *J Virol.* 79:2050-7.
- Mautino, G., F. Capony, J. Bousquet, and A.M. Vignola. 1999. Balance in asthma between matrix metalloproteinases and their inhibitors. *J Allergy Clin Immunol.* 104:530-3.
- McCurdy, L.H., and B.S. Graham. 2003. Role of plasma membrane lipid microdomains in respiratory syncytial virus filament formation. *J Virol.* 77:1747-56.
- McFadden, G., and D. Kelvin. 1997. New strategies for chemokine inhibition and modulation: you take the high road and I'll take the low road. *Biochem Pharmacol.* 54:1271-80.
- McIntosh, K., H.B. Masters, I. Orr, R.K. Chao, and R.M. Barkin. 1978. The immunologic response to infection with respiratory syncytial virus in infants. *J Infect Dis.* 138:24-32.
- McKay LI, and JA Cidlowski. 1999. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocrinol Rev;* 20: 435-59.
- McNamara, P.S., and R.L. Smyth. 2002. The pathogenesis of respiratory syncytial virus disease in childhood. *Br Med Bull.* 61:13-28.
- McQuibban, G.A., G.S. Butler, J.H. Gong, L. Bendall, C. Power, I. Clark-Lewis, and C.M. Overall. 2001. Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. *J Biol Chem.* 276:43503-8.
- McQuibban, G.A., J.H. Gong, E.M. Tam, C.A. McCulloch, I. Clark-Lewis, and C.M. Overall. 2000. Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science.* 289:1202-6.
- McQuibban, G.A., J.H. Gong, J.P. Wong, J.L. Wallace, I. Clark-Lewis, and C.M. Overall. 2002. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood.* 100:1160-7.
- Message, S.D., and S.L. Johnston. 2002. Viruses in asthma. *Br Med Bull.* 61:29-43.
- Midulla, F., A. Villani, J.R. Panuska, I. Dab, J.K. Kolls, R. Merolla, and R. Ronchetti. 1993. Respiratory syncytial virus lung infection in infants: immunoregulatory role of infected alveolar macrophages. *J Infect Dis.* 168:1515-9.
- Miller, A.L., T.L. Bowlin, and N.W. Lukacs. 2004. Respiratory syncytial virus-induced chemokine production: linking viral replication to chemokine production in vitro and in vivo. *J Infect Dis.* 189:1419-30.
- Miller, A.L., C. Gerard, M. Schaller, A.D. Gruber, A.A. Humbles, and N.W. Lukacs. 2006. Deletion of CCR1 attenuates pathophysiologic responses during respiratory syncytial virus infection. *J Immunol.* 176:2562-7.
- Miller, A.L., R.M. Strieter, A.D. Gruber, S.B. Ho, and N.W. Lukacs. 2003. CXCR2 regulates respiratory syncytial virus-induced airway hyperreactivity and mucus overproduction. *J Immunol.* 170:3348-56.
- Miller, L.H., S.J. Mason, J.A. Dvorak, M.H. McGinniss, and I.K. Rothman. 1975. Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinants. *Science.* 189:561-3.
- Moore, J.P., A. Trkola, and T. Dragic. 1997. Co-receptors for HIV-1 entry. *Curr Opin Immunol.* 9:551-62.
- Mosier, D.E., G.R. Picchio, R.J. Gulizia, R. Sabbe, P. Poignard, L. Picard, R.E. Offord, D.A. Thompson, and J. Wilken. 1999. Highly potent RANTES analogues either prevent CCR5-using human immunodeficiency virus type 1 infection in vivo or rapidly select for CXCR4-using variants. *J Virol.* 73:3544-50.
- Mufson, M.A., H.D. Levine, R.E. Wasil, H.E. Mocega-Gonzalez, and H.E. Krause. 1973. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection among infants and children in Chicago. *Am J Epidemiol.* 98:88-95.
- Mummidi, S., S.S. Ahuja, B.L. McDaniel, and S.K. Ahuja. 1997. The human CC chemokine receptor 5 (CCR5) gene. Multiple transcripts with 5'-end heterogeneity, dual promoter usage, and evidence for polymorphisms within the regulatory regions and noncoding exons. *J Biol Chem.* 272:30662-71.
- Munoz, F.M., P.A. Piedra, and W.P. Glezen. 2003. Safety and immunogenicity of respiratory syncytial virus purified fusion protein-2 vaccine in pregnant women. *Vaccine.* 21:3465-7.

- Murdoch, C., and A. Finn. 2000a. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*. 95:3032-43.
- Murdoch, C., and A. Finn. 2000b. Chemokine receptors and their role in vascular biology. *J Vasc Res*. 37:1-7.
- Muro, S., E.M. Minshall, and Q.A. Hamid. 2000. The pathology of chronic asthma. *Clin Chest Med*. 21:225-44.
- Murphy, B.R., D.W. Alling, M.H. Snyder, E.E. Walsh, G.A. Prince, R.M. Chanock, V.G. Hemming, W.J. Rodriguez, H.W. Kim, B.S. Graham, and et al. 1986a. Effect of age and preexisting antibody on serum antibody response of infants and children to the F and G glycoproteins during respiratory syncytial virus infection. *J Clin Microbiol*. 24:894-8.
- Murphy, B.R., G.A. Prince, E.E. Walsh, H.W. Kim, R.H. Parrott, V.G. Hemming, W.J. Rodriguez, and R.M. Chanock. 1986b. Dissociation between serum neutralizing and glycoprotein antibody responses of infants and children who received inactivated respiratory syncytial virus vaccine. *J Clin Microbiol*. 24:197-202.
- Murphy, F.A., C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, S.A. Ghabrial, A.W. Jarvis, G.P. Martelli, M.A. Mayo, M.D. Summers. 1995. Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Springer-Verlag Wien. New-York.
- Murphy, P.M. 2000. Viral antichemokines: from pathogenesis to drug discovery. *J Clin Invest*. 105:1515-7.
- Murphy, P.M. 2001. Viral exploitation and subversion of the immune system through chemokine mimicry. *Nat Immunol*. 2:116-22.
- Murphy, P.M., M. Baggiolini, I.F. Charo, C.A. Hebert, R. Horuk, K. Matsushima, L.H. Miller, J.J. Oppenheim, and C.A. Power. 2000. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*. 52:145-76.
- Nagase, H., M. Miyamasu, M. Yamaguchi, H. Kawasaki, K. Ohta, K. Yamamoto, Y. Morita, and K. Hirai. 2000. Glucocorticoids preferentially upregulate functional CXCR4 expression in eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*. 106:1132-9.
- Neote, K., J.Y. Mak, L.F. Kolakowski, Jr., and T.J. Schall. 1994. Functional and biochemical analysis of the cloned Duffy antigen: identity with the red blood cell chemokine receptor. *Blood*. 84:44-52.
- New, D.C., and Y.H. Wong. 2003. CC chemokine receptor-coupled signalling pathways. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*. 35:779-88.
- Noah, T.L., I.A. Wortman, and S. Becker. 1998. The effect of fluticasone propionate on respiratory syncytial virus-induced chemokine release by a human bronchial epithelial cell line. *Immunopharmacology*. 39:193-9.
- Ohtbayashi, H. 2002. Matrix metalloproteinases in lung diseases. *Curr Protein Pept Sci*. 3:409-21.
- Olmsted, R.A., and P.L. Collins. 1989. The 1A protein of respiratory syncytial virus is an integral membrane protein present as multiple, structurally distinct species. *J Virol*. 63:2019-29.
- Olszewska-Pazdrak, B., A. Casola, T. Saito, R. Alam, S.E. Crowe, F. Mei, P.L. Ogra, and R.P. Garofalo. 1998a. Cell-specific expression of RANTES, MCP-1, and MIP-1alpha by lower airway epithelial cells and eosinophils infected with respiratory syncytial virus. *J Virol*. 72:4756-64.
- Olszewska-Pazdrak, B., K. Pazdrak, P.L. Ogra, and R.P. Garofalo. 1998b. Respiratory syncytial virus-infected pulmonary epithelial cells induce eosinophil degranulation by a CD18-mediated mechanism. *J Immunol*. 160:4889-95.
- Openshaw, P.J. 2001. Potential mechanisms causing delayed effects of respiratory syncytial virus infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 163:S10-3.
- Openshaw, P.J., G.S. Dean, and F.J. Culley. 2003. Links between respiratory syncytial virus bronchiolitis and childhood asthma: clinical and research approaches. *Pediatr Infect Dis J*. 22:S58-64; discussion S64-5.
- Oppenheim JJ, H.O., Goetzl E. 2000. Chemotactic factors, neuropeptides, and other ligands for seven transmembrane receptors, London. 985-1021 pp.
- Ortmann, D., M. Ohuchi, H. Angliker, E. Shaw, W. Garten, and H.D. Klenk. 1994. Proteolytic cleavage of wild type and mutants of the F protein of human parainfluenza virus type 3 by two subtilisin-like endoproteases, furin and Kex2. *J Virol*. 68:2772-6.
- Osur, S.L. 2002. Viral respiratory infections in association with asthma and sinusitis: a review. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 89:553-60.
- Ottolini, M.G., and V.G. Hemming. 1997. Prevention and treatment recommendations for respiratory syncytial virus infection. Background and clinical experience 40 years after discovery. *Drugs*. 54:867-84.

- Panina-Bordignon, P., and D. D'Ambrosio. 2003. Chemokines and their receptors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med.* 9:104-10.
- Panuska, J.R., R. Merolla, N.A. Rebert, S.P. Hoffmann, P. Tsivitse, N.M. Cirino, R.H. Silverman, and J.A. Rankin. 1995. Respiratory syncytial virus induces interleukin-10 by human alveolar macrophages. Suppression of early cytokine production and implications for incomplete immunity. *J Clin Invest.* 96:2445-53.
- Papadopoulos, N.G., S. Psarras, E. Manoussakis, and P. Saxoni-Papageorgiou. 2003. The role of respiratory viruses in the origin and exacerbations of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 3:39-44.
- Pastey, M.K., J.E. Crowe, Jr., and B.S. Graham. 1999. RhoA interacts with the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and facilitates virus-induced syncytium formation. *J Virol.* 73:7262-70.
- Patel, H., R. Platt, J.M. Lozano, and E.E. Wang. 2004. Glucocorticoids for acute viral bronchiolitis in infants and young children. *Cochrane Database Syst Rev*:CD004878.
- Patel, J.A., M. Kunimoto, T.C. Sim, R. Garofalo, T. Elliott, S. Baron, O. Ruuskanen, T. Chonmaitree, P.L. Ogra, and F. Schmalstieg. 1995. Interleukin-1 alpha mediates the enhanced expression of intercellular adhesion molecule-1 in pulmonary epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 13:602-9.
- Patella, V., G. Florio, A. Petraroli, and G. Marone. 2000. HIV-1 gp120 induces IL-4 and IL-13 release from human Fc epsilon RI+ cells through interaction with the VH3 region of IgE. *J Immunol.* 164:589-95.
- Pazdrak, K., D. Schreiber, P. Forsythe, L. Justement, and R. Alam. 1995. The intracellular signal transduction mechanism of interleukin 5 in eosinophils: the involvement of lyn tyrosine kinase and the Ras-Raf-1-MEK-microtubule-associated protein kinase pathway. *J Exp Med.* 181:1827-34.
- Pearce, N., J. Pekkanen, and R. Beasley. 1999. How much asthma is really attributable to atopy? *Thorax.* 54:268-72.
- Peebles, R.S., Jr. 2004. Viral infections, atopy, and asthma: is there a causal relationship? *J Allergy Clin Immunol.* 113:S15-8.
- Pemberton, R.M., M.J. Cannon, P.J. Openshaw, L.A. Ball, G.W. Wertz, and B.A. Askonas. 1987. Cytotoxic T cell specificity for respiratory syncytial virus proteins: fusion protein is an important target antigen. *J Gen Virol.* 68 (Pt 8):2177-82.
- Penton-Rol, G., M. Cota, N. Polentarutti, W. Luini, S. Bernasconi, A. Borsatti, A. Sica, G.J. LaRosa, S. Sozzani, G. Poli, and A. Mantovani. 1999. Up-regulation of CCR2 chemokine receptor expression and increased susceptibility to the multitropic HIV strain 89.6 in monocytes exposed to glucocorticoid hormones. *J Immunol.* 163:3524-9.
- Peterlin, B.M., and D. Trono. 2003. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat Rev Immunol.* 3:97-107.
- Piedimonte, G. 2002. Origins of reactive airways disease in early life: do viral infections play a role? *Acta Paediatr Suppl.* 91:6-11.
- Pierce, K.L., R.T. Premont, and R.J. Lefkowitz. 2002. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:639-50.
- Plotnicky-Gilquin, H., A. Robert, L. Chevalet, J.F. Haeuw, A. Beck, J.Y. Bonnefoy, C. Brandt, C.A. Siegrist, T.N. Nguyen, and U.F. Power. 2000. CD4(+) T-cell-mediated antiviral protection of the upper respiratory tract in BALB/c mice following parenteral immunization with a recombinant respiratory syncytial virus G protein fragment. *J Virol.* 74:3455-63.
- Polack, F.P., and R.A. Karron. 2004. The future of respiratory syncytial virus vaccine development. *Pediatr Infect Dis J.* 23:S65-73.
- Ponath, P.D., S. Qin, T.W. Post, J. Wang, L. Wu, N.P. Gerard, W. Newman, C. Gerard, and C.R. Mackay. 1996. Molecular cloning and characterization of a human eotaxin receptor expressed selectively on eosinophils. *J Exp Med.* 183:2437-48.
- Powell, H., and P.G. Gibson. 2003. Inhaled corticosteroid doses in asthma: an evidence-based approach. *Med J Aust.* 178:223-5.
- Power, U.F., T. Huss, V. Michaud, H. Plotnicky-Gilquin, J.Y. Bonnefoy, and T.N. Nguyen. 2001a. Differential histopathology and chemokine gene expression in lung tissues following respiratory syncytial virus (RSV) challenge of formalin-inactivated RSV- or BBG2Na-immunized mice. *J Virol.* 75:12421-30.
- Power, U.F., T.N. Nguyen, E. Rietveld, R.L. de Swart, J. Groen, A.D. Osterhaus, R. de Groot, N. Corvaia, A. Beck, N. Bourveret-Le-Cam, and J.Y. Bonnefoy. 2001b. Safety and immunogenicity of a novel

- recombinant subunit respiratory syncytial virus vaccine (BBG2Na) in healthy young adults. *J Infect Dis.* 184:1456-60.
- Power, U.F., H. Plotnicky-Gilquin, T. Huss, A. Robert, M. Trudel, S. Stahl, M. Uhlen, T.N. Nguyen, and H. Binz. 1997. Induction of protective immunity in rodents by vaccination with a prokaryotically expressed recombinant fusion protein containing a respiratory syncytial virus G protein fragment. *Virology.* 230:155-66.
- Price, J. 2000. The role of inhaled corticosteroids in children with asthma. *Arch Dis Child.* 82 Suppl 2:II10-4.
- Proudfoot, A.E. 2002. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev Immunol.* 2:106-15.
- Proudfoot, A.E., C.A. Power, A.J. Hoogewerf, M.O. Montjovent, F. Borlat, R.E. Offord, and T.N. Wells. 1996. Extension of recombinant human RANTES by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist. *J Biol Chem.* 271:2599-603.
- Renauld, J.C. 2001. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol.* 54:577-89.
- Roberts, S.R., D. Lichtenstein, L.A. Ball, and G.W. Wertz. 1994. The membrane-associated and secreted forms of the respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G are synthesized from alternative initiation codons. *J Virol.* 68:4538-46.
- Romagnani, P., A. De Paulis, C. Beltrame, F. Annunziato, V. Dente, E. Maggi, S. Romagnani, and G. Marone. 1999. Tryptase-chymase double-positive human mast cells express the eotaxin receptor CCR3 and are attracted by CCR3-binding chemokines. *Am J Pathol.* 155:1195-204.
- Rosenkilde, M.M. 2005. Virus-encoded chemokine receptors--putative novel antiviral drug targets. *Neuropharmacology.* 48:1-13.
- Rosenkilde, M.M., and T.W. Schwartz. 2004. The chemokine system -- a major regulator of angiogenesis in health and disease. *Apmis.* 112:481-95.
- Rosenkilde, M.M., M. Waldhoer, H.R. Lutichau, and T.W. Schwartz. 2001. Virally encoded 7TM receptors. *Oncogene.* 20:1582-93.
- Rot, A., M. Krieger, T. Brunner, S.C. Bischoff, T.J. Schall, and C.A. Dahinden. 1992. RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. *J Exp Med.* 176:1489-95.
- Rothenberg, M.E. 1999. Eotaxin. An essential mediator of eosinophil trafficking into mucosal tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 21:291-5.
- Russi, J.C., A. Delfraro, M.D. Borthagaray, B. Velazquez, B. Garcia-Barreno, and M. Hortal. 1993. Evaluation of immunoglobulin E-specific antibodies and viral antigens in nasopharyngeal secretions of children with respiratory syncytial virus infections. *J Clin Microbiol.* 31:819-23.
- Sallusto, F., C.R. Mackay, and A. Lanzavecchia. 1997. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science.* 277:2005-7.
- Samson, M., F. Libert, B.J. Doranz, J. Rucker, C. Liesnard, C.M. Farber, S. Saragosti, C. Lapoumeroulie, J. Cognaux, C. Forcellie, G. Muyldermans, C. Verhofstede, G. Burtonboy, M. Georges, T. Imai, S. Rana, Y. Yi, R.J. Smyth, R.G. Collman, R.W. Doms, G. Vassart, and M. Parmentier. 1996. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature.* 382:722-5.
- Santoro, F., L. Vassena, and P. Lusso. 2004. Chemokine receptors as new molecular targets for antiviral therapy. *New Microbiol.* 27:17-29.
- Schmidt, A.C., T.R. Johnson, P.J. Openshaw, T.J. Braciale, A.R. Falsey, L.J. Anderson, G.W. Wertz, J.R. Groothuis, G.A. Prince, J.A. Melero, and B.S. Graham. 2004. Respiratory syncytial virus and other pneumoviruses: a review of the international symposium--RSV 2003. *Virus Res.* 106:1-13.
- Schmidt, A.C., D.R. Wenzke, J.M. McAuliffe, M. St Claire, W.R. Elkins, B.R. Murphy, and P.L. Collins. 2002. Mucosal immunization of rhesus monkeys against respiratory syncytial virus subgroups A and B and human parainfluenza virus type 3 by using a live cDNA-derived vaccine based on a host range-attenuated bovine parainfluenza virus type 3 vector backbone. *J Virol.* 76:1089-99.
- Sears, M.R., B. Burrows, E.M. Flannery, G.P. Herbison, and M.D. Holdaway. 1993. Atopy in childhood. I. Gender and allergen related risks for development of hay fever and asthma. *Clin Exp Allergy.* 23:941-8.
- Seet, B.T., and G. McFadden. 2002. Viral chemokine-binding proteins. *J Leukoc Biol.* 72:24-34.
- Shaheen, F., and R.G. Collman. 2004. Co-receptor antagonists as HIV-1 entry inhibitors. *Curr Opin Infect Dis.* 17:7-16.
- Shih, M. 2002. CCR3 signaling in Eosinophils. In Pathways: Interactive graphic models of molecular and cellular pathways. Biocarta, editor.

- Sigurs, N. 2001. Epidemiologic and clinical evidence of a respiratory syncytial virus-reactive airway disease link. *Am J Respir Crit Care Med.* 163:S2-6.
- Silvestri, M., F. Sabatini, L. Scarso, A. Cordone, G. Dasic, and G.A. Rossi. 2002. Fluticasone propionate downregulates nasal fibroblast functions involved in airway inflammation and remodeling. *Int Arch Allergy Immunol.* 128:51-8.
- Simmons, G., P.R. Clapham, L. Picard, R.E. Offord, M.M. Rosenkilde, T.W. Schwartz, R. Buser, T.N. Wells, and A.E. Proudfoot. 1997. Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist. *Science.* 276:276-9.
- Smith, G.L. 1996. Virus proteins that bind cytokines, chemokines or interferons. *Curr Opin Immunol.* 8:467-71.
- Sodhi, A., S. Montaner, and J.S. Gutkind. 2004. Viral hijacking of G-protein-coupled-receptor signalling networks. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:998-1012.
- Soukup, J.M., and S. Becker. 2003. Role of monocytes and eosinophils in human respiratory syncytial virus infection in vitro. *Clin Immunol.* 107:178-85.
- Sozzani, S., W. Luini, G. Bianchi, P. Allavena, T.N. Wells, M. Napolitano, G. Bernardini, A. Vecchi, D. D'Ambrosio, D. Mazzeo, F. Sinigaglia, A. Santoni, E. Maggi, S. Romagnani, and A. Mantovani. 1998. The viral chemokine macrophage inflammatory protein-II is a selective Th2 chemoattractant. *Blood.* 92:4036-9.
- Sparer, T.E., S. Matthews, T. Hussell, A.J. Rae, B. Garcia-Barreno, J.A. Melero, and P.J. Openshaw. 1998. Eliminating a region of respiratory syncytial virus attachment protein allows induction of protective immunity without vaccine-enhanced lung eosinophilia. *J Exp Med.* 187:1921-6.
- Spender, L.C., T. Hussell, and P.J. Openshaw. 1998. Abundant IFN-gamma production by local T cells in respiratory syncytial virus-induced eosinophilic lung disease. *J Gen Virol.* 79 (Pt 7):1751-8.
- Srikiatkachorn, A., and T.J. Braciale. 1997. Virus-specific memory and effector T lymphocytes exhibit different cytokine responses to antigens during experimental murine respiratory syncytial virus infection. *J Virol.* 71:678-85.
- Srikiatkachorn, A., W. Chang, and T.J. Braciale. 1999. Induction of Th-1 and Th-2 responses by respiratory syncytial virus attachment glycoprotein is epitope and major histocompatibility complex independent. *J Virol.* 73:6590-7.
- Stantchev, T.S., and C.C. Broder. 2001. Human immunodeficiency virus type-1 and chemokines: beyond competition for common cellular receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 12:219-43.
- Stein, J.V., and C. Nombela-Arrieta. 2005. Chemokine control of lymphocyte trafficking: a general overview. *Immunology.* 116:1-12.
- Storch, G.A., and C.S. Park. 1987. Monoclonal antibodies demonstrate heterogeneity in the G glycoprotein of prototype strains and clinical isolates of respiratory syncytial virus. *J Med Virol.* 22(4):345-356.
- Stine, J.T., C. Wood, M. Hill, A. Epp, C.J. Raport, V.L. Schweickart, Y. Endo, T. Sasaki, G. Simmons, C. Boshoff, P. Clapham, Y. Chang, P. Moore, P.W. Gray, and D. Chantry. 2000. KSHV-encoded CC chemokine vMIP-III is a CCR4 agonist, stimulates angiogenesis, and selectively chemoattracts TH2 cells. *Blood.* 95:1151-7.
- Strieter, R.M., P.J. Polverini, S.L. Kunkel, D.A. Arenberg, M.D. Burdick, J. Kasper, J. Dzuiba, J. Van Damme, A. Walz, D. Marriott, and et al. 1995. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem.* 270:27348-57.
- Takeuchi, T., M. Hisanaga, M. Nagao, N. Ikeda, H. Fujii, F. Koyama, T. Mukogawa, H. Matsumoto, S. Kondo, C. Takahashi, M. Noda, and Y. Nakajima. 2004. The membrane-anchored matrix metalloproteinase (MMP) regulator RECK in combination with MMP-9 serves as an informative prognostic indicator for colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 10:5572-9.
- Tebbey, P.W., M. Hagen, and G.E. Hancock. 1998. Atypical pulmonary eosinophilia is mediated by a specific amino acid sequence of the attachment (G) protein of respiratory syncytial virus. *J Exp Med.* 188:1967-72.
- Teixeira, M.M., T.N. Wells, N.W. Lukacs, A.E. Proudfoot, S.L. Kunkel, T.J. Williams, and P.G. Hellewell. 1997. Chemokine-induced eosinophil recruitment. Evidence of a role for endogenous eotaxin in an in vivo allergy model in mouse skin. *J Clin Invest.* 100:1657-66.
- Teng, M.N., and P.L. Collins. 2002. The central conserved cystine noose of the attachment G protein of human respiratory syncytial virus is not required for efficient viral infection in vitro or in vivo. *J Virol.* 76:6164-71.

- Teng, M.N., S.S. Whitehead, and P.L. Collins. 2001. Contribution of the respiratory syncytial virus G glycoprotein and its secreted and membrane-bound forms to virus replication in vitro and in vivo. *Virology*. 289:283-96.
- Thomas, L.H., M. Sharland, and J.S. Friedland. 2002. Steroids fail to down-regulate respiratory syncytial virus-induced IL-8 secretion in infants. *Pediatr Res*. 52:368-72.
- Tripp, R.A., A. Dakhama, L.P. Jones, A. Barskey, E.W. Gelfand, and L.J. Anderson. 2003. The G glycoprotein of respiratory syncytial virus depresses respiratory rates through the CX3C motif and substance P. *J Virol*. 77:6580-4.
- Tripp, R.A., L. Jones, and L.J. Anderson. 2000. Respiratory syncytial virus G and/or SH glycoproteins modify CC and CXC chemokine mRNA expression in the BALB/c mouse. *J Virol*. 74:6227-9.
- Tripp, R.A., L.P. Jones, L.M. Haynes, H. Zheng, P.M. Murphy, and L.J. Anderson. 2001. CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein. *Nat Immunol*. 2:732-8.
- Tripp, R.A., D. Moore, L. Jones, W. Sullender, J. Winter, and L.J. Anderson. 1999. Respiratory syncytial virus G and/or SH protein alters Th1 cytokines, natural killer cells, and neutrophils responding to pulmonary infection in BALB/c mice. *J Virol*. 73:7099-107.
- Ugucioni, M., C.R. Mackay, B. Ochensberger, P. Loetscher, S. Rhis, G.J. LaRosa, P. Rao, P.D. Ponath, M. Baggiolini, and C.A. Dahinden. 1997. High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines. *J Clin Invest*. 100:1137-43.
- van Woensel, J.B., W.M. van Aalderen, W. de Weerd, N.J. Jansen, J.P. van Gestel, D.G. Markhorst, A.J. van Vught, A.P. Bos, and J.L. Kimpen. 2003. Dexamethasone for treatment of patients mechanically ventilated for lower respiratory tract infection caused by respiratory syncytial virus. *Thorax*. 58:383-7.
- Walsh, E.E., M.W. Brandriss, and J.J. Schlesinger. 1987. Immunological differences between the envelope glycoproteins of two strains of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol*. 68 (Pt 8):2169-76.
- Walsh, E.E., and J. Hruska. 1983. Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: identification of the fusion protein. *J Virol*. 47:171-7.
- Wang, J.M., H. Ueda, O.M. Howard, M.C. Grimm, O. Chertov, X. Gong, W. Gong, J.H. Resau, C.C. Broder, G. Evans, L.O. Arthur, F.W. Ruscetti, and J.J. Oppenheim. 1998. HIV-1 envelope gp120 inhibits the monocyte response to chemokines through CD4 signal-dependent chemokine receptor down-regulation. *J Immunol*. 161:4309-17.
- Wang, S.Z., and K.D. Forsyth. 2000. The interaction of neutrophils with respiratory epithelial cells in viral infection. *Respirology*. 5:1-10.
- Warringa, R.A., L. Koenderman, P.T. Kok, J. Kreukniet, and P.L. Bruijnzeel. 1991. Modulation and induction of eosinophil chemotaxis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. *Blood*. 77:2694-700.
- Weissman, D., R.L. Rabin, J. Arthos, A. Rubbert, M. Dybul, R. Swofford, S. Venkatesan, J.M. Farber, and A.S. Fauci. 1997. Macrophage-tropic HIV and SIV envelope proteins induce a signal through the CCR5 chemokine receptor. *Nature*. 389:981-5.
- Wellems, G. 1992-a. Bovine Respiratory Syncytial Virus. Virus infection of ruminants. *Elsevier Scientific*. 363-375.
- Wellems, G. 1992-b. Bovine Respiratory Syncytial virus. Ovine and Caprine. Respiratory Syncytial Virus. *Elsevier Scientific*. 377-378.
- Welliver, R.C., M. Sun, D. Rinaldo, and P.L. Ogra. 1986. Predictive value of respiratory syncytial virus-specific IgE responses for recurrent wheezing following bronchiolitis. *J Pediatr*. 109:776-80.
- Wertz, G.W., W.M. Sullender. 1992. Approaches to immunization against respiratory syncytial virus. *Biotechnology*. 20:151-176
- White, M.V., T. Yoshimura, W. Hook, M.A. Kaliner, and E.J. Leonard. 1989. Neutrophil attractant/activation protein-1 (NAP-1) causes human basophil histamine release. *Immunol Lett*. 22:151-4.
- Wills-Karp, M., and S.L. Ewart. 2004. Time to draw breath: asthma-susceptibility genes are identified. *Nat Rev Genet*. 5:376-87.
- Xiao, H., C. Neuveut, H.L. Tiffany, M. Benkirane, E.A. Rich, P.M. Murphy, and K.T. Jeang. 2000. Selective CXCR4 antagonism by Tat: implications for in vivo expansion of coreceptor use by HIV-1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97:11466-71.

- Yarovinsky, F., J.F. Andersen, L.R. King, P. Caspar, J. Aliberti, H. Golding, and A. Sher. 2004. Structural determinants of the anti-HIV activity of a CCR5 antagonist derived from *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem.* 279:53635-42.
- Yazdanbakhsh, M., P.G. Kremsner, and R. van Ree. 2002. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science.* 296:490-4.
- Ye, J., L.L. Kohli, and M.J. Stone. 2000. Characterization of binding between the chemokine eotaxin and peptides derived from the chemokine receptor CCR3. *J Biol Chem.* 275:27250-7.
- Yong, V.W., C. Power, P. Forsyth, and D.R. Edwards. 2001. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 2:502-11.
- Zach, T.L., L.D. Hill, V.A. Herrman, M.P. Leuschen, and M.K. Hostetter. 1992. Effect of glucocorticoids on C3 gene expression by the A549 human pulmonary epithelial cell line. *J Immunol.* 148:3964-9.
- Zhou, N., Z. Luo, J. Luo, J.W. Hall, and Z. Huang. 2000. A novel peptide antagonist of CXCR4 derived from the N-terminus of viral chemokine vMIP-II. *Biochemistry.* 39:3782-7.

