

Thèse de Doctorat

Julien Pogu

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : *Biologie-Santé*

Discipline : *Sciences de la vie et de la santé*

Spécialité : *Immunologie*

Unité de recherche : *INSERM U1064*

Soutenu le *30 octobre 2015*

Thèse N° : *36*

Etude des effets tolérogènes d'inducteurs de l'hème-oxygénase-1 dans les maladies auto-immunes

JURY

Rapporteurs : **Alain LE MOINE**, MD, PhD directeur de service associé, Université libre de Bruxelles
Abdelhadi SAOUDI, Directeur de Recherche 1^{re} classe CNRS, Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan

Examineurs : **Sylvaine YOU**, Chargée de Recherche 1^{re} classe INSERM, Université Paris Descartes
Philippe BLANCOU, Maître de conférences en immunologie-virologie, Université de Nice Sophia Antipolis

Remerciements :

Je tiens à remercier vivement le Dr Alain Le Moine ainsi que le Dr Abdelhadi Saoudi d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, ainsi que le Dr Sylvaine You et le Dr Philippe Blancou pour avoir examiné ce travail.

Je tiens à remercier le Dr Bernard Vanhove et le Dr Jean-François Fonteneau pour leurs participations à mon comité de thèse.

Je tiens également à remercier très chaleureusement le Dr Ignacio Anegon pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire et intégré dans son équipe. Je reste admiratif par votre passion intacte pour la science et votre capacité à gérer l'ensemble des tâches qui vous incombent, tout en étant d'une disponibilité à toute épreuve. Merci pour vos conseils qui m'ont permis de m'améliorer tout au long de ces 3 années. Ce fut un réel plaisir de partager cette aventure à vos côtés.

Je tiens à remercier de façon plus personnelle le Dr Philippe Blancou que je connaissais avant même d'avoir l'idée de faire une thèse. Ta gentillesse, ta vivacité d'esprit, ta motivation et ton optimisme à toute épreuve ont été autant de qualités qui m'ont permis de passer une super thèse. Merci infiniment pour tous tes conseils et ta joie de vivre communicative, je te souhaite le meilleur à Nice, ils ont de la chance de t'avoir.

Je tiens à remercier mon co-encadrant le Dr Thomas Simon. Difficile de trouver par où commencer tellement tu m'as apporté d'un point de vue professionnel (je précise car je ne voudrais pas que tu interprètes ça comme une déclaration d'amour ;). Merci infiniment pour le temps que tu as consacré à me former. Je me souviens des fins de manips à 1h ou 2H du matin, ou encore de la préparation de mon premier séminaire. Ton abnégation dans le travail, ta qualité scientifique et ta bonne humeur quotidienne m'ont été plus que précieuses pour réaliser cette thèse. Même à plus de 5000km tu es resté et tu restes disponible et prêt à me prodiguer tes conseils précieux et pour ça je t'en remercie. Merci aussi pour l'extra-professionnel et les soirées. Certaines d'entre-elles sont assez mémorables. En espérant, avoir le plaisir un jour de retravailler avec toi.

Je tiens également à remercier le Dr Séverine Remy pour son aide au combien précieuse. Tu t'es coltiné le Julien à ces débuts, en master1, puis à la fin de sa thèse, pas les meilleurs périodes mais pour ma part ça a été un réel plaisir de travailler avec toi durant ces 5 années. Tu es une personne adorable et je suis sûr que tu te souviendras de ma date de naissance toute ta vie, merci à toi ;) Merci également à Maud, venue en renfort sur la dernière année. Ton aide a été précieuse pour cette troisième année chargée.

Je veux également remercier l'ensemble de l'équipe 2, je ne citerai pas tout le monde car nous sommes devenus trop nombreux. Merci à Séverine B pour son aide à toute heure sur l'ARIA et à Elodie P, désolé de vous avoir un peu embêté avec ma maniaquerie ;). Merci à Laurent et Renald pour leurs conseils bio-mol et un grand merci à tous les autres...

Merci à Coraline et Lucile mes deux du labo, vous êtes des geeks géniales, j'ai passé des supers moments en votre compagnie. Le prix Nobel n'est pas loin...je pense qu'il y a juste un petit contretemps qui devrait être réglé d'ici peu. Vous êtes les danseuses les plus talentueuses qu'il m'a été donné de voir. Merci pour le soutien durant ces trois années. On n'avait pas le même bateau mais on a traversé la même mer (j'ai essayé un truc littéraire pour Lucile mais ça sonne pas terrible). Coraline, je ferais bien une dédicace sur ton vélo et

ton magnifique gilet jaune mais moi et les vélos ce n'est pas une histoire qui roule... (Littérature quand tu nous tiens).

Merci également à Flora et Mélanie pour leurs petites attentions (Merveilleux ou autres cookies) quand je n'avais pas la pêche, ainsi que de m'avoir initié aux potins du labo, grâce ou à cause de vous ça commence à m'intéresser. Merci à Vanessa pour tes conseils précieux en histo (la saponine c'est top...ou pas), et de m'avoir fait tester tes créations culinaires.

Merci à Cédric et Gaëlle B pour vos tuyaux pour le post doc, et votre aide pour ma présentation à FOCIS. Merci et pardon à Caro, Françoise, Sabrina, Elodie A, et les autres que j'ai pu embêter avec une lame de malassez mal lavée ou une hotte pas éteinte en culture (pas toujours moi, je tiens à le préciser). Parler avec vous lors de journées bien chargées était toujours un réel plaisir. Enfin désolé aux gens que je n'ai pas cités mais la liste est trop longue, vous pouvez toujours venir me voir pour vous plaindre ;)

Je souhaite remercier, mon crew : les K1ri (Nico, Raph, Alex, Isma, Seb et le frangin). Même si on se voit moins tous ensemble qu'à une époque, à chaque fois c'est énorme. Merci Raph pour toutes ces soirées durant ces trois années de thèse ça m'a permis de lâcher prise...plein de bons souvenirs et flous souvenirs en tête ;) Merci à mon plus vieux pote Alex, de la cour de récréation de la primaire Louis Armand à ma thèse toujours là, même si on se voit moins qu'avant, je kiffe te savoir dans le secteur. Merci Seb, on n'a pas souvent l'occasion de se voir à cause de la distance mais à chaque fois c'est des supers moments. Isma ou Lebron je ne sais plus trop ;) merci pour ton soutien durant ces trois années, une spéciale dédicace à ta femme même si ce n'est pas un K1ri ;) ses muffins et autres raclettes déchirent. Merci Nico, c'est une chance rare d'avoir une personne comme toi dans ses amis proches, et ça compte beaucoup dans un exercice comme celui de la thèse. Merci à Angy Knowles, pas un K1ri non plus mais connaît très bien le sujet des K1ri;) Merci au frangin, pas toujours facile entre nous à une époque...je veux bien prendre ma part de responsabilité ;), je ne te le dis pas souvent mais tu es un exemple pour moi Docteur et ceci explique peut-être cela....

Je souhaite remercier la personne qui a partagé mon quotidien, mes doutes, mes joies durant la quasi-totalité de cette thèse. Merci à toi Deborah, tu as été un appui de taille, un soutien permanent. Difficile de résumer en quelques lignes l'influence positive que tu as eue sur moi...je voulais que tu saches qu'il y aura toujours un peu de toi en moi et pour ça je t'en remercie.

Je terminerai par ma famille, pour Guillaume, se reporter plus haut ;) Fanny, on parle beaucoup tous les deux ;) mais je vais te le redire, je suis sûr que tu feras une excellente avocate ou magistrat d'exception, comme tu veux. Il m'arrive de te chambrer un peu parfois mais c'est une façon maladroite de te dire que je tiens très fort à toi. Papa, Maman...on part de loin je sais...c'est vrai que mon parcours d'élève modèle et sage aurait dû vous rassurer mais bizarrement ça n'a pas été le cas...je ne vous en veux pas ;) Papa, tu es un modèle pour moi, je peux que te remercier pour ton éducation et accessoirement pour les repas toujours prêt et délicieux lors de la rédaction de ce manuscrit, ça m'a fait gagner un temps précieux. Maman, merci pour ton amour de tous les jours, pour la passion de la science que tu m'as transmise. Ton organisation est un Graal que j'espère atteindre un jour, même si j'aurais aimé qu'elle soit directement inscrite dans mes gènes. Je vous remercie toi et Deborah pour la correction des quelques fautes d'orthographe qui ont échappé à mon œil d'expert ;)

Sommaire :

Remerciements :	2
Sommaire :	4
Liste des abréviations :	8
Liste des figures :	12
Liste des tableaux :	14
Résumé	15
Abstract	16
INTRODUCTION	17
1 De la tolérance immunitaire à l'auto-immunité:	18
1.1 La tolérance centrale :	19
1.1.1 La sélection positive :	20
1.1.2 L'engagement dans la lignée simple positif :	23
1.1.3 Sélection négative :	26
1.2 Tolérance périphérique :	28
1.2.1 L'ignorance :	30
1.2.2 L'anergie :	32
1.2.3 Le switch phénotypique :	33
1.2.4 La délétion clonale :	35
1.3 Cellules impliquées dans le maintien de la tolérance périphérique :	37
1.3.1 Lymphocytes T régulateurs :	37
1.3.2 Cellules extra-thymiques exprimant AIRE (eTAC) :	40
1.3.3 Cellules présentatrices d'antigènes :	41
1.3.3.1 Macrophages :	41
1.3.3.1.1 Les macrophages M1 et M2 :	43
1.3.3.1.2 Les macrophages tolérogènes :	45
1.3.3.2 Cellules dendritiques :	46
1.3.3.2.1 Les différentes sous populations de cellules dendritiques :	47
1.3.3.2.2 Maturation des cellules dendritiques :	49
1.3.3.2.3 Les cellules dendritiques de l'immunité à la tolérance :	52
1.3.3.2.4 Les cellules dendritiques dérivées de monocytes :	55
1.3.3.2.5 L'activation des LT par les moDC :	57
1.4 Rupture de tolérance et auto-immunité :	58
1.4.1 Le diabète de type 1 :	59
1.4.1.1 Epidémiologie :	60

1.4.1.2	Physiopathologie :.....	61
1.4.2	La sclérose en plaques :	64
1.4.2.1	Physiopathologie :.....	64
2	Les stratégies d'induction de tolérance : De l'immunosuppression généralisée à l'immuno-modulation antigène spécifique:.....	66
2.1	Les stratégies d'immunosuppressions généralisées:.....	67
2.1.1	Les agents chimiques et modes d'actions :	67
2.1.2	Les anticorps monoclonaux (AcMo) :	69
2.1.2.1	Modulation de la réponse immunitaire par les anticorps monoclonaux:	70
2.1.2.2	Limite à l'utilisation des anticorps monoclonaux :	73
2.2	L'induction de tolérance antigène spécifique :	73
2.2.1	L'administration de peptide soluble :	74
2.2.2	Thérapie génique :	76
2.2.3	Thérapie cellulaire :.....	78
2.2.3.1	Lymphocyte T reg :	78
2.2.3.2	Cellules présentatrices d'antigène :.....	78
2.2.4	Utilisation des nanoparticules :.....	81
3	L'hème-oxygénase-1, de la dégradation de l'hème à la cible thérapeutique :	83
3.1	L'Hème-oxygénase-1 :	86
3.1.1	Localisation tissulaire :	86
3.1.2	Localisation subcellulaire :.....	86
3.1.3	Structure du gène de l'HO-1 :.....	87
3.1.4	Les facteurs de transcription et voies de signalisation impliqués dans la régulation d'hmox-1 :.....	89
3.1.5	Régulation de l'expression de l'HO-1 par des miRNA :.....	91
3.1.6	Les différentes classes d'inducteurs de l'HO-1 :	92
3.1.7	Modulation de l'expression de l'HO-1 par les métalloporphyrines :.....	93
3.2	l'HO-1 et son rôle dans la cytoprotection cellulaire :	94
3.2.1	Les propriétés anti-oxydantes de l'HO-1 :.....	94
3.2.2	Les propriétés anti-apoptotiques de l'HO-1 :	95
3.3	Rôle de L'HO-1 dans la régulation du système immunitaire :	97
3.3.1	L'HO-1 une enzyme anti-inflammatoire :	97
3.3.1.1	Régulation de l'inflammasome par l'hème-oxygénase-1 :.....	99
3.3.2	Immunorégulation de l'HO-1 :.....	100

3.3.2.1	Modulation des lymphocytes par l'HO-1 :	100
3.3.2.2	Modulation des macrophages par l'HO-1 :	102
3.3.2.3	Modulation des cellules dendritiques par l'HO-1 :	103
3.4	Tolérance immunitaire par induction de l'HO-1 :	106
3.4.1	L'induction systémique de l'HO-1 dans la SEP et l'EAE :	106
3.4.2	L'induction systémique de l'HO-1 dans le DT1 :	108
Projet de recherche :		111
Résultats		113
Discussion et perspectives :		167
Bibliographie :		177
Annexes :		211

Liste des abréviations :

AAV : Adeno Associated Virus

AcMo : Anticorps monoclonal

ADCC : Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AICD : Activation-Induced Cell Death

AIRE : Autoimmune regulator

ARE : Antioxidant Response Element

AP-1 : Activator protein-1

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

ARE : Antioxidant Response Element

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

ASC : Apoptosis-associated Speck-like protein containing Card

ASP-1 : Autoimmune polyendocrine syndrome type 1

ASGPR : asialoglycoprotein receptor

BB : BioBreeding

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2

BCR : B cell receptor

CAV-1 : Caveolin 1

CD : Cluster de Différentiation

CLP : Ligature caecale et ponction

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CoPP : Cobalt (III) Protoporphyrin IX chloride

CPR : Cytochrome P450 Réductase

CCR : Chemokine receptor

cTEC : cortical Thymic epithelial cells

CTLA-4 : Cytotoxic t-Lymphocyte-Associated Protein 4

DAMP : Danger Associated Molecular Pattern

DC : Dendritic cell

DHOD : Dihydroorotate dehydrogenase

DN : Double négatif

Domaine D : Domaine de diversité
Domaine J : Domaine de jonction
Domaine V : Domaine de variabilité
DP : Double Positif
DT1 : Diabète de Type-1
DTH : Delayed-type Hypersensitivity
EAE : Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale
eTAC : extrathymic *Aire*-expressing cells
FoxP3 : Forkhead box P3
GAD 65 : Glutamate déshydrogénase 65
GST : Glutathione S transferase
HA : Hémagglutinine
HLA : Human Leukocyte Antigen
HO : Hème-oxygénase
IL : Interleukine
iTreg : Lymphocyte T régulateur induit
IDO : Indoleamine 2,3-dioxygénase
Ig : Immunoglobuline
IGRP : islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein
IMPDH : inosine monophosphate dehydrogenase
IP : Intrapéritonéale
IPEX : Immunodysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked syndrome
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
IV : Intraveineuse
JNK : c-Jun N-terminal kinases
Keap-1 : Kelch-like ECH-associated protein 1
KO : Knock Out
LB : Lymphocyte B
LCMV : Lymphocytic Choriomeningitis Virus
LPS : Lipopolysaccharide
LT : Lymphocyte T

LTreg : Lymphocyte T régulateur
MBP : myeline basic protein
miRNA : micro RiboNucleic Acid
MOG : Myeline Oligodendrocytes Protein
MPAK : Mitogen-Activated Protein Kinases
mTEC : medullary Thymic epithelial cells
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NF- κ B : Nuclear Factor-kappa B
NLR : NOD-like receptors
NOD : The non-obese diabetic mouse
Nrf-2 : Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
nLTreg : Lymphocyte T régulateur naturel
PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Patterns
PI3K : PhosphoInositide 3-Kinase
PLP : ProteoLipid Protein
PR : Polyarthrite Rhumatoïde
PRR : Pathogen Recognition Receptor
RE : Réticulum endoplasmique
ROS : Reactive Oxygen Specie
SCID : Severe Combined ImmunoDeficiency
SEP : Sclérose En Plaques
SNC : Système Nerveux Centrale
SNP : Single-Nucleotide Polymorphism
SnPP : Tin-protoporphyrin IX
SI : Système immunitaire
SP : Simple Positif
TCR : T cell receptor
TGF- β : Transforming growth factor beta
Th : T helper cell
TLR : Toll-like receptors
TNF : Tumor Necrosis Factor

TSA : tissue-specific antigens

UV : Ultra-Violet

VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule-1

VLA-4 : Very Late Antigen-4

Liste des figures :

Figures introduction :

Figure 1: Développement des LT dans le thymus.

Figure 2: Réarrangement génique conduisant à la formation du TCR.

Figure 3: Modèle cinétique de l'engagement vers le stade thymocyte simple positif.

Figure 4: La sélection des LT dans le thymus en fonction de l'affinité de leur TCR pour des peptides du soi.

Figure 5: Illustration du mécanisme d'ignorance induit par une faible expression de l'auto-antigène.

Figure 6: Polarisation des LTCD4 en fonction de l'environnement cytokinique.

Figure 7: Les différents mécanismes de tolérances en périphérie.

Figure 8: Les différents mécanismes suppressifs des LTreg.

Figure 9: Polarisation et phénotype des macrophages M1 et M2.

Figure 10: Ontogénie des cellules dendritiques chez la souris.

Figure 11: Activation d'un LT par une cellule dendritique.

Figure 12: Facteurs favorisant la génération de cellules dendritiques tolérogènes.

Figure 13: Facteurs extrinsèques et intrinsèques favorisant le développement de maladies auto-immunes idiopathiques.

Figure 14: Evènements immunologiques conduisant au DT1.

Figure 15: Représentation schématique d'un anticorps et d'un ScFv

Figure 16: Mode d'action de la modulation de la réponse immunitaire par les anticorps monoclonaux.

Figure 17 : Induction de tolérance antigène spécifique par l'administration de CPA chargé avec un autoantigène.

Figure 18: L'HO-1 dégrade l'hème en trois produits de dégradation.

Figure 19: Comparatif de la structure d'hemo-1 chez la souris et l'homme.

Figure 20: Les différentes voies de signalisation et facteurs de transcription impliqués dans l'induction de l'HO-1.

Figure 21: Réaction de Fenton.

Figure 22: Mécanismes cytoprotecteurs médiés par l'HO-1.

Figure 23 : Modulation des DC par l'HO-1.

Figures discussion :

Figure 24 : L'injection intradermique de CoPP induit l'expression de l'HO-1 dans différentes populations cellulaires du ganglion drainant le site de l'injection.

Figure 25: Phénotypage des LTCD8 spécifique de l'OVA après traitement OVA ou CoPPOVA.

Figure 26: Incidence du DT1 après traitement ou non des Tc1 au monoxyde de carbone.

Figure 27: Incidence du DT1 après déplétion ou non des LTCD4.

Liste des tableaux :

Tableau 1: Phénotype des macrophages selon leur localisation tissulaire chez la souris.

Tableau 2 : Les différents TLR et leurs ligands respectifs.

Tableau 3: Phénotype comparatif des macrophages et cellules dendritiques dérivées de monocytes chez la souris.

Tableau 4: Les différents modes d'actions des immunosuppresseurs chimiques.

Résumé

Un des obstacles majeurs à la prévention et au traitement des maladies auto-immunes réside dans la difficulté d'inhiber la réponse lymphocytaire T de manière antigène spécifique. Pour répondre à cette problématique, nous nous sommes intéressés aux inducteurs de l'hème-oxygénase (HO-1), dont les propriétés immuno-régulatrices ont été mises en évidence dans de nombreux modèles animaux. Nous avons donc développé un protocole innovant capable de tolérer de manière antigène spécifique des lymphocytes T (LT) auto-réactifs dans un modèle murin de maladie auto-immune neurodégénérative (EAE), et dans un modèle de diabète de type 1 (DT1). Ce protocole est basé sur la co-administration par voie intradermique (ID) d'un inducteur de l'HO-1 et d'un auto-antigène. Ce traitement induit le recrutement, dans le ganglion drainant, de cellules dendritiques dérivées de monocytes exprimant l'HO-1, capables de tolérer les LT auto-réactifs. Suite à ce traitement, les LT spécifiques de l'antigène présentent un défaut de migration dans l'organe cible, associé à une altération de leur cytosquelette. La vitesse et la migration de ces LT tolérés sont également affectées. Afin d'évaluer la pertinence clinique de ce protocole de tolérance, nous avons démontré que l'injection ID d'un inducteur de l'HO-1, associé à un autoantigène, induit une inhibition transitoire de la réponse lymphocytaire chez le babouin dans un modèle d'hypersensibilité retardée (DTH). Ces résultats montrent que l'utilisation d'inducteurs de l'HO-1 en clinique représente une approche prometteuse dans le développement de tolérance antigène spécifique pour des patients souffrant de maladies auto-immunes.

Mots clés

Hème-oxygénase-1, Auto-immunité, Tolérance, Lymphocytes T auto-réactifs, Primates, Inflammation, Leucocyte, Migration

Abstract

One barrier to prevention and treatment of autoimmune diseases is the difficulty of antigen-specific tolerization of ongoing T-cell responses. Heme oxygenase-1 (HO-1) inducers are clinically approved drugs for non immune-related diseases that have shown anti-inflammatory properties in rodent models. We developed a protocol to tolerize ongoing autoreactive T-cells response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and type 1 diabetes (T1D) mice models by intradermal co-injection of HO-1 chemical inducer and autoantigen. This treatment induced recruitment in the draining lymph node of HO-1-expressing monocyte-derived DC (MoDC) that tolerized autoreactive pathogenic T-cells. Tolerized autoreactive T-cells showed impaired migration to the targeted organs that was associated with altered cytoskeleton, transmigration and velocity properties. Moreover, human T-cell clones showed reduced mobility following incubation with monocytes treated with HO-1 inducer. To explore the clinical relevance of this tolerisation protocol, we showed that intradermal injection of a clinically approved HO-1 inducer and antigen in primates extinguish delayed type hypersensitivity (DTH) for at least 2 month in all animals treated. Overall, clinically approved HO-1-inducers represent a promising approach for induction of antigen-specific tolerance in patients suffering from immune-mediated diseases.

Key Words

Heme-oxygenase, Autoimmunity, Tolerance, Cytotoxic T-cells, Primates, Inflammation, Leukocyte, Migration

INTRODUCTION

1 De la tolérance immunitaire à l'auto-immunité:

Le système immunitaire (SI) protège l'organisme d'une très grande variété de pathogènes et joue un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Afin d'effectuer cette fonction, le SI doit relever un défi majeur en distinguant les composants dits du « soi » c'est-à-dire ceux de l'hôte, et les composants du « non-soi », c'est-à-dire étranger. Cependant, la notion de « soi » présente un caractère acquis et non inné comme démontré par les expériences en transplantation de Peter Medawar [1]. Ce dernier met en évidence que l'injection de cellules vivantes provenant d'une souche de souris CBA injectées dans une souris adulte de souche A sont rapidement détruites par le système immunitaire et que par la suite la transplantation de tissu issu de la souche CBA est impossible. Cependant, si les cellules issues de la souche CBA sont injectées très précocement (au stade fœtus ou nouveau-né), ces dernières ne sont pas détruites et la transplantation de tissu de la souche CBA sur la souche A est possible et le greffon n'est jamais rejeté. Par cette expérience, il démontre l'existence d'un processus d'éducation du SI au « soi », la tolérance au « soi ».

Ce processus se déroule tout d'abord dans les organes lymphoïdes primaires (thymus et moelle osseuse) sièges du développement respectivement des lymphocytes T (LT) et lymphocytes B (LB) [2]. Au cours du développement dans le thymus, les LT suivent un processus de sélection positive [3] puis négative permettant la sélection de LT capables de reconnaître des antigènes du non-soi et l'élimination des LT auto-réactifs (c'est à dire des LT reconnaissant le soi), c'est la tolérance centrale [4]. Un processus séquentiel similaire, que nous ne détaillerons pas dans cette thèse, permet la formation de LB fonctionnels et l'élimination des LB auto-réactifs au niveau de la moelle osseuse [5]. Les auto-antigènes n'étant pas tous exprimés par les organes lymphoïdes primaires, certains LT auto-réactifs ne sont pas éliminés lors de ce processus [6]. Afin de pallier à cela, des mécanismes de tolérance périphérique existent, notamment grâce à certains types cellulaires comme les

cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et les lymphocytes T régulateurs (LTreg) permettant de maintenir ces LT auto-réactifs sous contrôle [7]. Cependant, dans certaines conditions pathologiques, ces mécanismes de tolérance centrale et périphérique peuvent être défaillants conduisant à une rupture de tolérance au soi et donc au développement de maladies auto-immunes [8].

1.1 La tolérance centrale :

Le SI par l'intermédiaire des LB et LT, dispose de cellules capables de reconnaître l'immense diversité de motifs moléculaires potentiellement exprimés par les pathogènes [9][10]. Ce potentiel provient de l'expression de récepteurs respectivement BCR et TCR, exprimés à leur surface. Le mode de reconnaissance de l'antigène varie entre les LB qui reconnaissent directement une séquence peptidique via leur BCR, et les LT qui, via leur TCR, reconnaissent un complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) du soi associé à un peptide présenté par une cellule présentatrice d'antigène (CPA) [11]. Un lymphocyte T exprime à sa surface des TCR reconnaissant un seul et même complexe CMH du soi-peptide. Chaque lymphocyte exprimant un TCR d'affinité qui lui est propre, la diversité théorique maximale de TCR appelé répertoire T chez l'homme a été estimée à 10^{15} [12]. Ces récepteurs sont le fruit d'un réarrangement génique aléatoire codant pour différentes parties du TCR ou BCR. Cependant, le caractère aléatoire de ce phénomène peut conduire à la génération de récepteurs réactifs vis-à-vis des composants du soi. C'est pourquoi différents mécanismes régulateurs appelés sélection positive et sélection négative (figure 1) ont lieu au niveau des organes lymphoïdes primaires et permettent l'élimination des LT auto-réactifs [4]. Après ce processus de sélection (figure 1) la diversité théorique de TCR chez l'homme chute à environs 10^7 - 10^8 [13].

1.1.1 La sélection positive :

Les progéniteurs lymphoïdes dérivés des cellules souches hématopoïétiques quittent la moelle osseuse pour migrer vers le thymus où ils deviendront des thymocytes [14]. Ils se différencieront en deux classes de LT basées sur la nature du TCR qu'ils expriment, les $LT\alpha\beta$ et les $LT\gamma\delta$.

-Les $LT\gamma\delta$ ou encore LT non conventionnels possèdent un TCR composé d'une chaîne γ et d'une chaîne δ [15]. Ces LT représentent un peu moins de 5% de l'ensemble de la population totale des LT, et ont la particularité de pouvoir reconnaître leur antigène sans présentation par le CMH. Ces derniers jouent rôle important dans l'immunité anti-infectieuse [16].

-Les $LT\alpha\beta$ appelés LT conventionnels possèdent un TCR composé d'une chaîne α et d'une chaîne β . Suite à leur arrivée dans le thymus au niveau de la région corticale, les thymocytes à l'origine des $LT\alpha\beta$ sont qualifiés de double négatifs (DN) (figure 1) car n'exprimant ni le CD8 ni le CD4, marqueurs des deux grandes sous populations de LT conventionnels [14]. Ces thymocytes DN peuvent être subdivisés en quatre stades de différenciation de DN1 ($CD44+CD25-$) le plus précoce au DN4 ($CD44-CD25-$) le plus tardif, basé sur l'expression de la chaîne alpha du récepteur à l'IL-2 (CD25) et de la molécule d'adhésion CD44 [17]. Lors du passage de DN2 à DN4, les thymocytes subissent un premier réarrangement génique conduisant à l'expression d'une chaîne β fonctionnelle [14]. Ce réarrangement aléatoire (figure 2) est le fruit de la recombinaison de 3 segments de gènes appelés (V) variabilité, (D) diversité et (J) jonction codant pour des parties distinctes de la chaîne β [18] et est dépendant de l'activité enzymatique de RAG-1 et RAG2. Chez l'homme, il a été identifié de 40 à 42 segments $V\beta$ différents, deux segments $D\beta$ et 6 segments $J\beta$ différents [19]. La recombinaison aléatoire de ces segments à l'origine de la chaîne β représente une première étape dans la génération de la diversité des TCR exprimés par les

LT, on parle de diversité combinatoire. La deuxième étape se produit lors de la jonction des différents segments V D et J où des événements de délétion ou d'insertion nucléotidique se produisent, on parle de diversité jonctionnelle [20]. Une première sélection, appelée sélection β s'exerce à ce niveau [21]. Elle permet aux thymocytes exprimant correctement la chaîne β associée à une chaîne temporaire (pré-Talpha) de proliférer rapidement et de stopper le processus de réarrangement de la chaîne β . Les thymocytes n'ayant pas réussi à exprimer une chaîne β fonctionnelle meurent par apoptose.

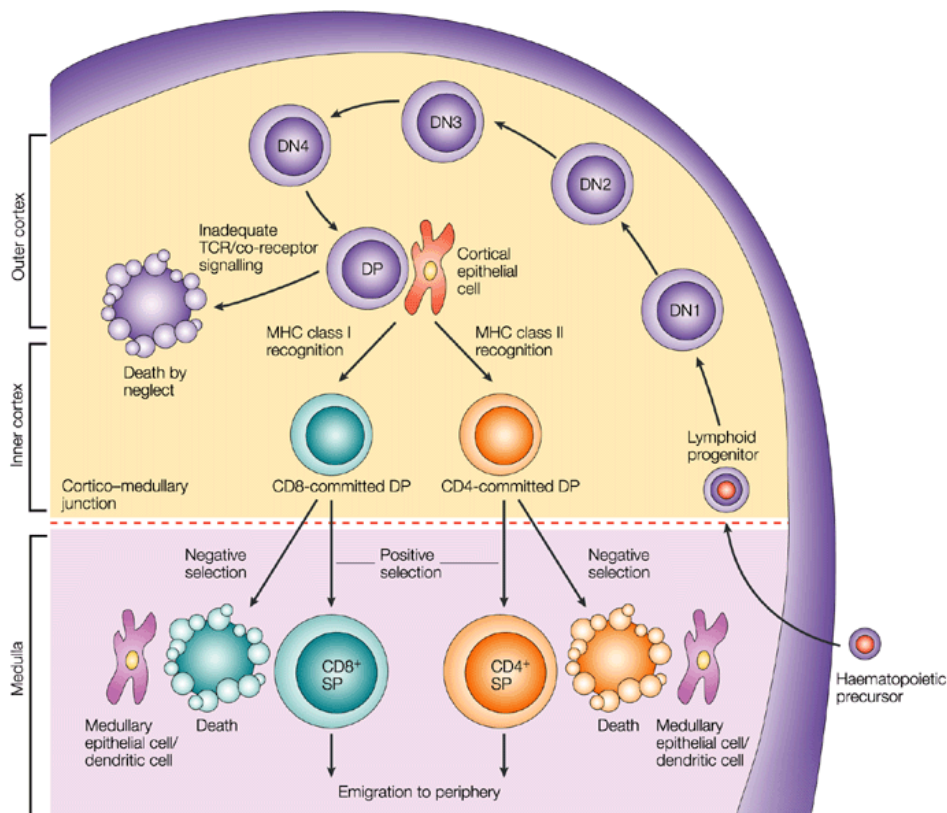


Figure 1: Développement des LT dans le thymus. Les progéniteurs lymphoïdes arrivent au niveau de la jonction cortico-médullaire et migrent du cortex vers la médulla suivant une succession d'étapes de maturation pour aboutir à la formation de LTCD4 ou CD8 naïfs. D'après [14].

Suite à la sélection β , le thymocyte va subir un processus de maturation vers un stade double positif (DP) où le réarrangement de la chaîne alpha va se produire [14]. Ce réarrangement génique consiste en l'association d'un segment V et d'un segment J. Chez l'homme, 43 segments $V\alpha$ et 50 segments $J\alpha$ ont été identifiés [18]. Une fois la chaîne α exprimée, le réarrangement génique s'arrête empêchant de fait l'expression de deux récepteurs reconnaissant des antigènes différents à la surface d'une même cellule. La chaîne α s'associe à la chaîne β pour former le TCR [14]. A ce stade, les thymocytes DP exprimant un TCR n'étant pas capables d'interagir avec le complexe CMH du soi peptide du soi exprimé par les cellules épithéliales thymiques corticales (cTEC) meurent par négligence [22]. C'est le cas de 90% des thymocytes DP. Les 10% restant sont sélectionnés positivement grâce à des signaux de survie liés à l'activation du CD3 associé au TCR, c'est la sélection positive [23]. Ce processus se produit dans la région corticale thymique et induit une restriction au CMH du soi comme démontré par les travaux des nobélisés Peter Doherty et Rolf Zinkernagel sur l'étude de LT cytotoxiques antiviraux [24]. En effet, ils démontrent que des LTCD8 anti-LCMV isolés de souris de CMH $H2^K$ (CMH de classe I chez la souris) sont capables de détruire par lyse cellulaire uniquement des cellules infectées exprimant un CMH $H2^K$. Des cellules infectées par le LCMV mais exprimant un CMH $H2^b$ ou tout autre CMH différent de K ne seront pas lysées par les LTCD8 isolés de souris de CMH de génotype $H2^K$.

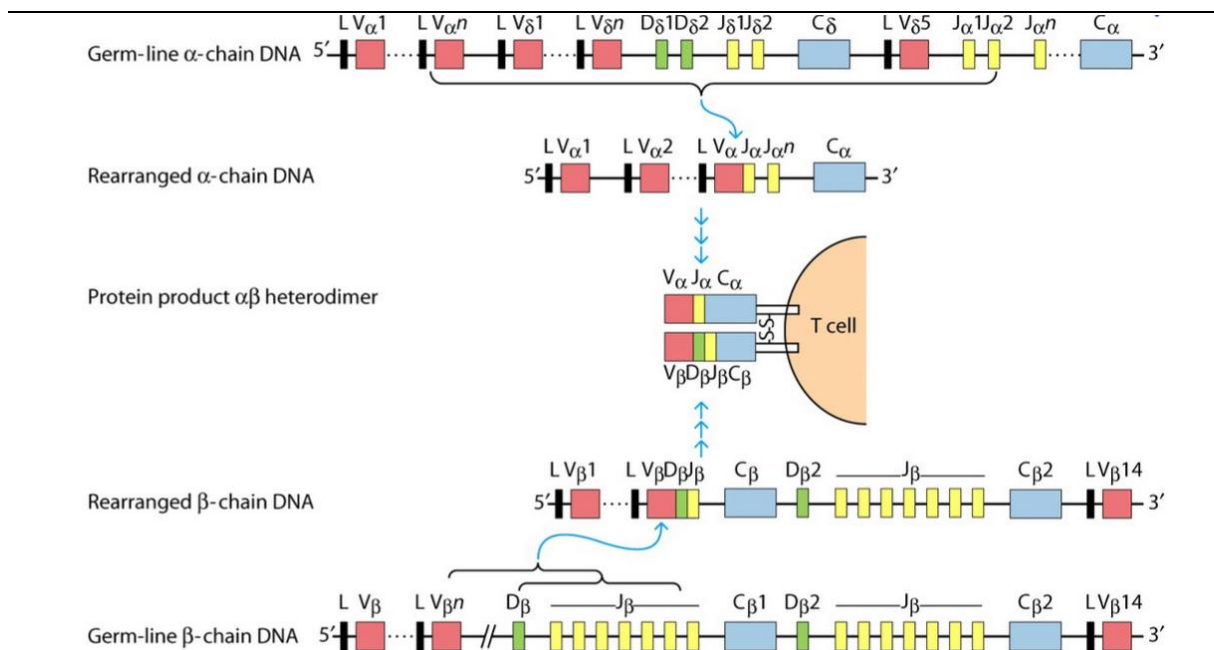


Figure 2: Réarrangement génique conduisant à la formation du TCR. En rouge les segments variabilité (V), en jaune les segments jonctionnalité (J) et en vert les segments diversité (D). D'après [25]

1.1.2 L'engagement dans la lignée simple positif :

Une fois sélectionnés positivement, les thymocytes DP passent au stade simple positif (SP) [26]. A ce jour, quatre hypothèses sont proposées afin d'expliquer l'engagement des thymocytes DP vers la lignée CD8 ou CD4.

-Le modèle dit stochastique, se basant sur un choix aléatoire et indépendant de la spécificité du TCR [27].

-Le modèle instructif, basé sur l'affinité du TCR [28]. Une interaction de forte intensité sera associée à un engagement dans la lignée CD4 et à l'inverse une interaction de faible intensité sera associée à un engagement dans la lignée CD8.

- Le modèle instructif basé sur le temps de l'interaction avec le TCR [29]. Un signal de longue durée est associé à une inhibition de l'expression du CD8 et donc un engagement dans la lignée CD4. A l'inverse, un signal court sera associé à un engagement dans la lignée CD8.

-Le dernier modèle proposé à l'heure actuelle (figure 3) est le modèle cinétique et se base sur l'évaluation de la signalisation du TCR en l'absence du CD8 [30]. En effet, la sélection positive entraîne une diminution de l'expression du CD8 à la surface des thymocytes DP. Si en l'absence de CD8 la signalisation médiée par le TCR persiste, alors le thymocyte s'engagera dans la lignée CD4. A l'inverse, si la signalisation cesse, le thymocyte s'engagera dans la lignée CD8.

Au stade SP, les thymocytes exprimant le corécepteur CD4 seront capables de reconnaître un des peptides présentés sur le CMH de classe II, alors que les thymocytes exprimant le corécepteur CD8 reconnaitront des peptides présentés sur le CMH de classe I.

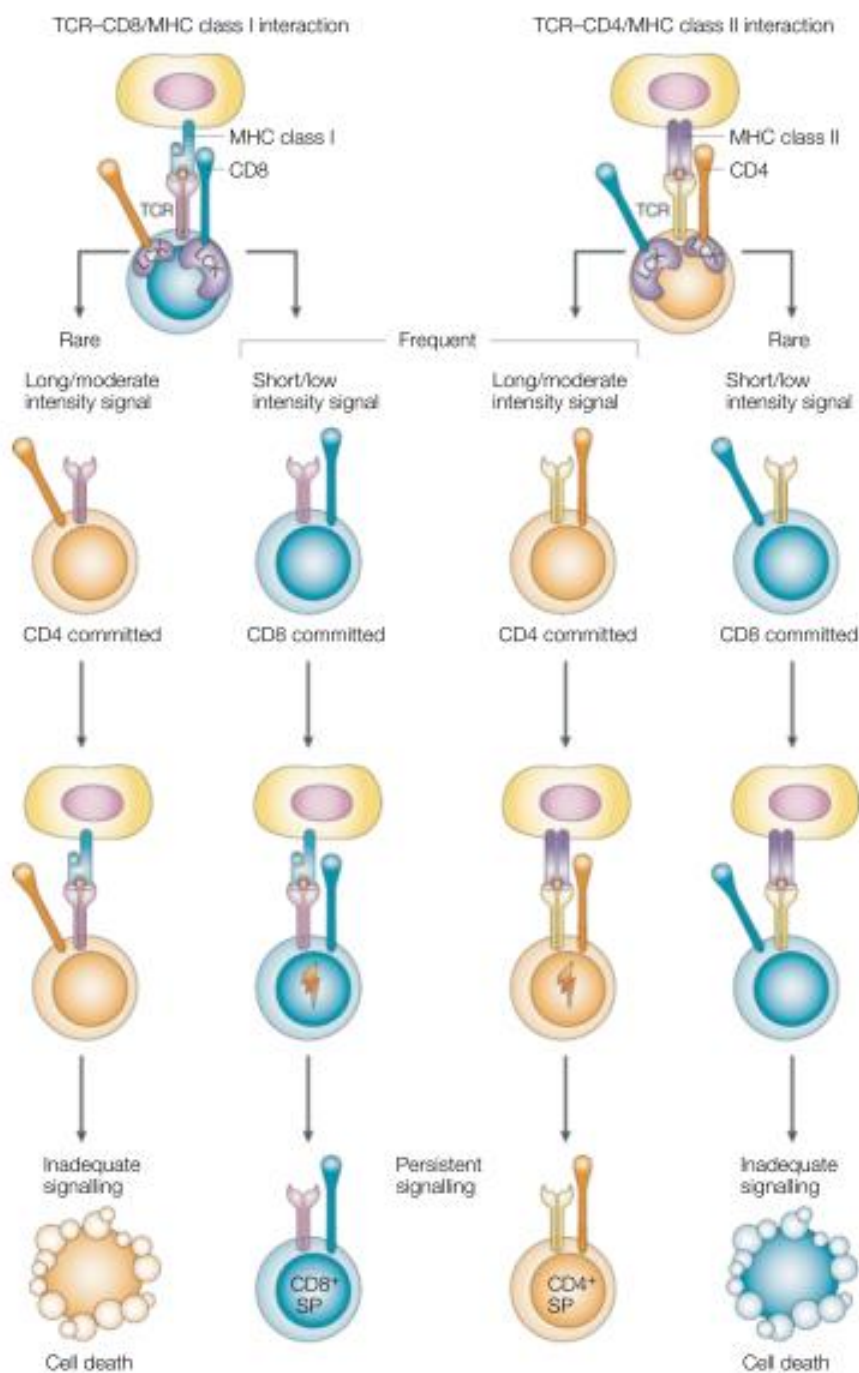


Figure 3: Model cinétique de l'engagement vers le stade thymocyte simple positif. A gauche du schéma l'engagement vers la lignée CD8, à droite l'engagement vers la lignée CD4. D'après [14]

1.1.3 Sélection négative :

Les thymocytes SP interagissent ensuite avec des cellules épithéliales thymiques médullaires (mTECs) au niveau de la région médullaire thymique (figure 1). Il a été mis en évidence par l'équipe de Diane Mathis [31] que les mTECs expriment un facteur de transcription appelé « the autoimmune regulator » (AIRE), permettant l'expression de peptides du soi spécifiques de tissus (TSA) qui ne sont pas exprimés dans le thymus tel que l'insuline. L'absence de AIRE suite à une mutation génique se traduit par le développement d'une polyendocrinopathie auto-immune de type 1 (ASP-1) mettant en avant le rôle clé de AIRE dans le maintien de la tolérance centrale. A ce stade, les thymocytes SP exprimant un TCR ayant une forte affinité pour les peptides du soi sont tolérés, c'est la sélection négative (figure 4) [4]. Comme nous le verrons un peu plus loin une forte interaction ne résulte pas nécessairement d'une tolérisation du thymocyte mais peut conduire à une différenciation en cellules régulatrices. La tolérisation de ces thymocytes passe par deux mécanismes :

-l'induction d'une mort cellulaire programmée (apoptose), c'est la délétion clonale (cf partie 1.2.4) [32].

- l'inhibition de la prolifération et des fonctions effectrices du thymocyte auto-réactif, c'est l'anergie (cf partie 1.2.2) [33]. Ce mécanisme semble concerner des LT auto-réactifs ayant une faible affinité pour les peptides du soi.

Bien que les mTEC soient connues pour exprimer des TSA au niveau du thymus, ces dernières possèdent une capacité limitée à tolérer les thymocytes auto-réactifs [34]. Il a ainsi été mis en évidence que des CPA appelées cellules dendritiques (DC) ayant un rôle clé dans l'activation des LT (cf) aident les mTEC dans la tolérisation des thymocytes auto-réactifs [35]. Ainsi, Hubert et al démontrent que les mTEC transfèrent les TSA aux DC thymiques qui tolèrent les thymocytes SP ayant un TCR de forte affinité pour les peptides

du soi. De plus, les mTECs exprimant AIRE recrutent les DC au niveau de la zone médullaire thymique en sécrétant un facteur soluble XCL-1 [36]. Le recrutement des DC à ce niveau est associé à la génération de lymphocytes T régulateurs (LTreg) participant à la tolérisation des thymocytes auto-réactifs. Outre le rôle des DC dans l'induction des LTreg, il a été reporté par Picca et al que certains thymocytes ayant une forte affinité pour des peptides du soi peuvent se différencier en LT reg [37]. Le facteur déterminant l'engagement du thymocyte vers une tolérisation (délétion clonale, anergie) plutôt qu'une différenciation en LTreg reposerait en partie sur une affinité du TCR plus forte pour le peptide du soi. En effet, il a été démontré que la diminution de l'expression du CMH de classe II à la surface des cellules mTEC est associé à une diminution de l'efficacité de sélection négative et une augmentation de la production de LTreg [38]. Les thymocytes SP n'ayant pas été éliminés lors de la sélection négative quittent le thymus pour rejoindre la circulation sanguine ou ils sont qualifiés de LTCD4 ou CD8 naïfs.

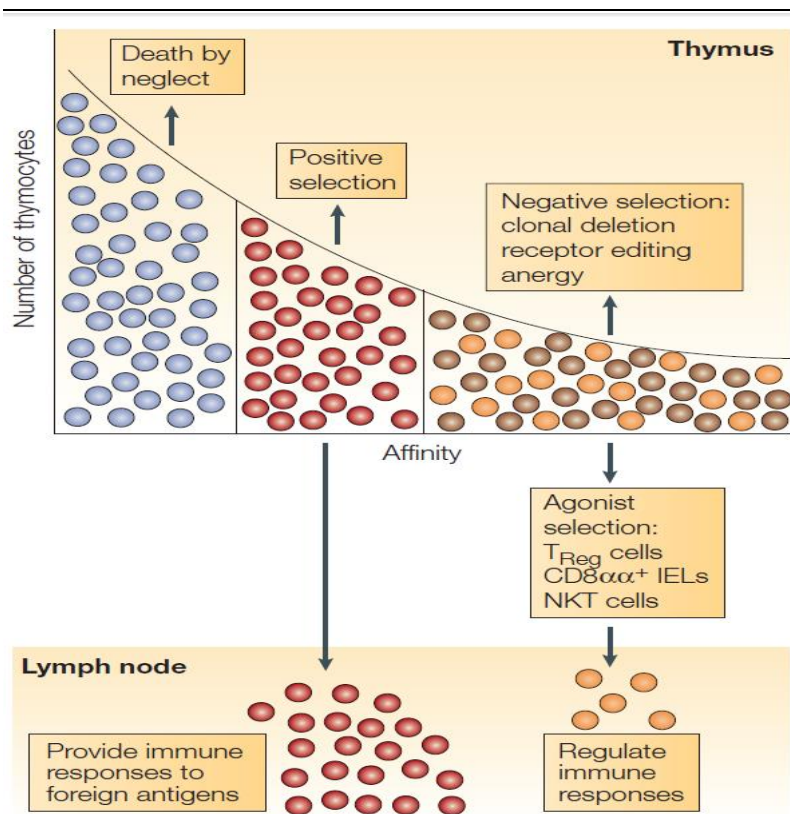


Figure 4: La sélection des LT dans le thymus en fonction de l'affinité de leur TCR pour des peptides du soi. Les LT ayant une affinité trop faible pour le CMH du soi meurent par négligence (cellules bleues). Les LT ayant une affinité moyenne pour les peptides du soi (cellules rouges) sont sélectionnés positivement. Les LT ayant une affinité trop forte (cellules marron) meurent par apoptose ou se différencient en cellules régulatrices (cellules orange) D'après [39]

1.2 Tolérance périphérique :

Comme décrit précédemment, la tolérance centrale permet l'élimination d'un grand nombre de LT auto-réactifs. Cependant, ce mécanisme n'est pas parfait et certains de ces LT peuvent être retrouvés en périphérie [40]. En effet, la délétion des LT en fonction de leur affinité pour les peptides du soi présente des limites quant à l'élimination de LT faiblement auto-réactifs [41]. Il a ainsi été démontré chez la souris que des LT spécifiques pour un

peptide dérivé de la myéline basic protein (MBP) exprimé au niveau du système nerveux central (SNC) échappent à la sélection négative du fait leur faible affinité pour ce peptide. L'absence de délétion de ces LT faiblement auto-réactifs pourrait s'expliquer par le fait que ces derniers augmentent la taille du répertoire T permettant une meilleure protection de l'organisme. La contrepartie étant que sous certaines conditions (infection virale, mimétisme moléculaire) ces LT faiblement auto-réactifs peuvent s'activer et induire des maladies auto-immunes [42]. Outre l'échappement de certains LT auto-réactifs de faible affinité, il a été mis en évidence que malgré l'expression de AIRE au niveau des mTEC tous les autoantigènes ne sont pas exprimés dans le thymus ne permettant pas l'élimination des LT spécifiques de ces antigènes [6]. Afin, de se prémunir d'une activation de ces LT auto-réactifs, des mécanismes de tolérances périphériques ont été décrit [22]. Ces mécanismes peuvent être divisés en deux sous-ensembles. Le premier sous-ensemble correspond à la tolérance dite passive liée à la fonction intrinsèque des cellules T. C'est le cas du mécanisme d'ignorance, d'anergie, de délétion clonale ou encore de switch phénotypique (figure 7). Le deuxième sous-ensemble correspond à la tolérance dite active dépendante de l'activité de cellules régulatrices.

1.2.1 L'ignorance :

Le concept d'ignorance (figure 5) découle de l'observation faite chez l'homme [43] et la souris [44] de la présence de LT auto-réactifs naïfs circulant en périphérie et n'induisant pas de réponse auto-immune [45]. Cette non activation des LT auto-réactifs peut résulter :

- De la faible expression de l'auto-antigène en périphérie [46],
- De l'incapacité des CPA à accéder aux auto-antigènes exprimés dans des sites immunologiquement privilégiés comme l'œil [47],
- De la présence d'un environnement chemokinique empêchant l'interaction LT-CPA [48],
- De l'incapacité des CPA à présenter l'auto-antigène leur surface [49].

Ces LT auto-réactifs restent fonctionnels et peuvent s'activer et développer leurs fonctions effectrices si leur antigène leur est présenté par des CPA activées [50]. Il a ainsi été démontré dans un modèle de souris transgénique dans lequel les cellules β expriment le LCMV, que l'injection de LTCD8 naïfs spécifiques du LCMV n'est pas associée au développement du diabète. De plus, Kurts et al [46] ont pu démontrer que la tolérance par l'ignorance repose sur le niveau d'expression de l'auto-antigène (figure 5). Pour cela ils ont utilisé deux modèles de souris transgéniques exprimant tous deux l'ovalbumine sous contrôle du promoteur de l'insuline Rip-OVA mais à un faible niveau pour l'un appelé Rip-OVA^{lo} et à un fort niveau pour l'autre appelé Rip-OVA^{hi}. Ils ont mis en évidence que l'injection d'une faible dose de LTCD8 naïfs (50 000) dérivés de souris OT-1 donc exprimant un TCR spécifique du peptide OVA257-264 dans des souris Rip-OVA^{hi} est associée à une élimination de ces derniers. A l'inverse, ces LTCD8 naïfs ne sont pas éliminés dans les souris Rip-OVA^{lo}. Ils mettent en évidence que l'élimination des LTCD8 naïfs dans les souris Rip-OVA^{hi} est liée à la cross présentation du peptide par les CPA du ganglion pancréatique. L'absence de cross présentation observée dans les Rip-OVA^{lo} semble expliquer la présence des OT-1

observé 4 semaines après leurs injections. De plus, ils démontrent que l'inhibition de la cross présentation dans les souris Rip-OVA^{hi} est associée à une absence d'élimination des LTCD8 dérivés d'OT-1. Ces résultats suggèrent que les CPA ne sont pas capables d'internaliser et de présenter cet auto-antigène aux LT auto-réactifs lorsqu'il est sous exprimé. L'accès restreint des CPA à certains organes qualifiés de sites immunologiques privilégiés comme l'œil [47] ou les testicules conduit également au phénomène d'ignorance [51]. Souvent décrit comme un mécanisme de tolérance passif il a été rapporté par Bromley et *al* [48] que certains facteurs solubles impliqués dans la migration des cellules immunitaires appelés chemokines peuvent empêcher l'interaction LT CPA sans affecter la survie et la capacité proliférative des LT. Dans cette étude *in vitro* ils mettent en évidence que certains gradients de chemokines comme (IP-10 ou encore MIP-3 β) peuvent stopper l'interaction entre un LT activé et son antigène présenté par une CPA. Ainsi, la migration du LT se fera préférentiellement à l'interaction avec l'antigène présenté par des CPA. Cette étude met en évidence que des mécanismes actifs peuvent conduire un à état d'ignorance. De même, l'ignorance vis-à-vis d'un antigène peut se produire si les CPA indispensables à l'activation des LT présentent des défauts fonctionnels [49]. Il a ainsi été démontré que des DC infiltrantes de tumeur perdent la capacité à internaliser des antigènes tumoraux et à les présenter sur le CMH II du fait de l'environnement tumoral tolérogène. En conclusion, l'ignorance s'avère un mécanisme de tolérance efficace et reste à l'heure actuelle peu étudié. Cependant, dans certaines conditions comme une infection virale l'ignorance peut être rompue conduisant au développement de réactions auto-immunes.

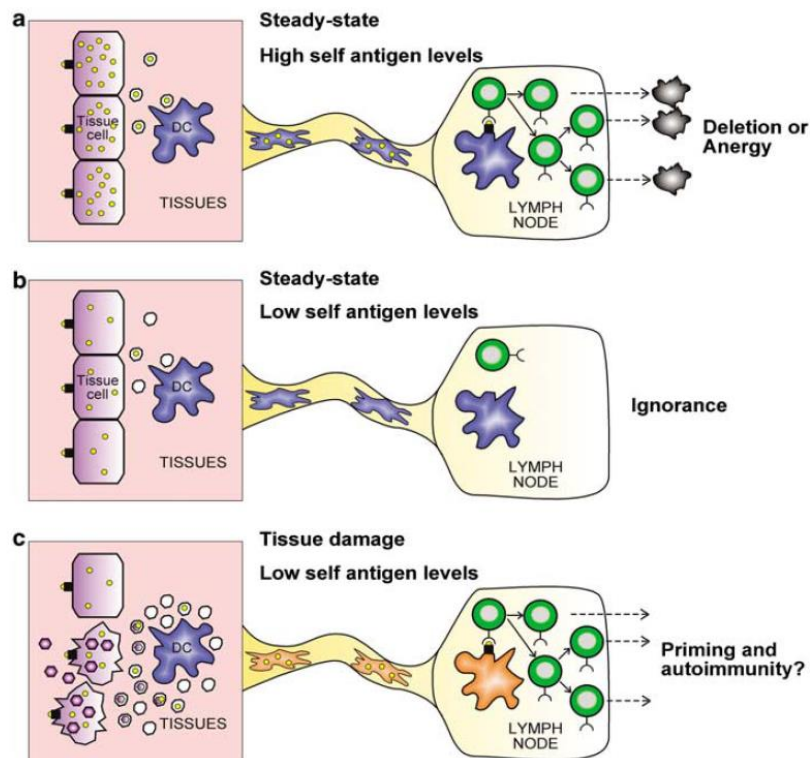


Figure 5: Illustration du mécanisme d'ignorance induit par une faible expression de l'auto-antigène. En (a) est représentée une situation dans laquelle l'auto-antigène est exprimé en grande quantité dans le tissu, induisant une déletion clonale ou une anergie des LT auto-réactifs. En (b), l'auto-antigène est faiblement exprimé dans le tissu conduisant à une ignorance des LT auto-réactifs vis-à-vis de cet antigène. En (c), des dommages tissulaires conduisent à une rupture de tolérance, l'antigène qui était alors ignoré dans la situation (b) est maintenant reconnu par les LT auto-réactifs. D'après [52]

1.2.2 L'anergie :

Le terme anergie fut inventé en 1908 par Von Pirquet pour décrire l'absence de réaction d'hypersensibilité retardée (DTH) à la tuberculine chez des individus infectés par le virus de la rougeole [53]. Aujourd'hui, l'anergie (figure 7) caractérise l'incapacité fonctionnelle des LTs à proliférer et à produire de l'IL-2 après reconnaissance de leur antigène (figure 3)

[53]. L'induction de l'anergie des LT fut pour la première fois démontrée par la stimulation de LTCD4 en absence de signaux de co-stimulation fournis par les CPA [54]. Cependant, l'anergie peut aussi se produire en présence de molécule de co-stimulation lorsque l'affinité entre le TCR et le complexe CMHpeptide est faible [55]. Comme nous l'avons vu en partie (1.1.3) ce mécanisme joue un rôle important dans la tolérance centrale. Cet état d'hyporéponse peut être levé par l'ajout d'IL-2 ou plus généralement dans un environnement pro-inflammatoire[56]. Les raisons du maintien en vie de ces LT sans possibilité d'exercer leurs fonctions effectrices posent question. Il est ainsi proposé que cet état d'hyporéponse permet de générer un pool de LT susceptibles de se différencier en LTreg [57].

1.2.3 Le switch phénotypique :

Les LTCD4 aussi appelés T helper (Th) une fois activés sont caractérisés par la nature de facteurs solubles qu'ils sécrètent appelés interleukines (IL) [58]. En fonction de la nature de ces interleukines, différentes sous-populations de Th peuvent être définies. On distingue principalement six classes majeures de Th : les Th0/Th1/Th2/Th17/Th9 ou encore LTreg (cf partie 1.3.1) (figure 6).

Les Th0 correspondent au LTCD4 naïfs.

Les Th1 sont caractérisés par la sécrétion d'IFN- γ et l'expression du facteur de transcription T-bet et seront principalement impliqués dans l'élimination des pathogènes intracellulaires tels que *Mycobacterium tuberculosis* ou *Leishmania major* [59].

Les Th2 se caractérisent par la sécrétion d'IL-4 et d'IL-5 et l'expression du facteur de transcription GATA3 et sont impliqués dans l'élimination des pathogènes extracellulaires tels *Nippostrongylus brasiliensis* [59].

Les Th17 quant à eux se caractérisent par l'expression de l'IL-17 et l'IL-22 et l'expression du facteur de transcription ROR γ t et sont impliqués dans l'élimination des bactéries extracellulaires tels que *Staphylococcus aureus* [60].

Les Th9 sont une population de Th récemment identifiée sécrétant de l'IL-9 et sont impliqués dans la production de mucus. Cependant leur caractérisation reste à préciser [59].

Les LTreg sont pour la majorité d'entre eux caractérisés par l'expression du facteur de transcription FoxP3 [61].

La polarisation vers tel ou tel profil est fortement influencée par l'environnement cytokinique généré principalement par les CPA durant l'activation des LTCD4 et correspondant au signal 3 d'activation du LT(cf 1.3.3.2.2) [11]. De plus, un LT helper d'une classe donnée peut modifier son profil cytokinique en fonction de l'environnement dans lequel il se situe. C'est ce qu'on appelle le switch phénotypique [59]. Ainsi, un iTreg peut « switcher » (figure 7) en LT Th1 pathogénique dans un environnement pro-inflammatoire [62]. Comme nous l'avons vu précédemment, un profil Th1 va être particulièrement efficace pour lutter contre *Mycobacterium tuberculosis* et un profil Th17 pour lutter contre *Staphylococcus aureus*. Toutefois, ce type de profil peut s'avérer particulièrement délétère pour certaines maladies auto-immunes telles que le diabète de type 1 (DT1) ou la sclérose en plaques (SEP) [63]. A l'inverse, un profil de type Th2 ou encore LTreg s'avère incapable d'induire le développement du diabète chez la souris [64][65]. Chez l'homme il a été mis en évidence que des LT auto-réactifs vis-à-vis de peptides provenant d'îlots de pancréas présentent une polarisation Th1 chez des patients diabétiques alors que chez des patients sains les LT auto-réactifs présentent un profil de LTreg sécrétant de l'IL-10 [66]. Ces données mettent en avant que la polarisation des Th auto-réactifs vers un profil non pathogénique est un moyen efficace de contrôler l'auto-réactivité en périphérie.

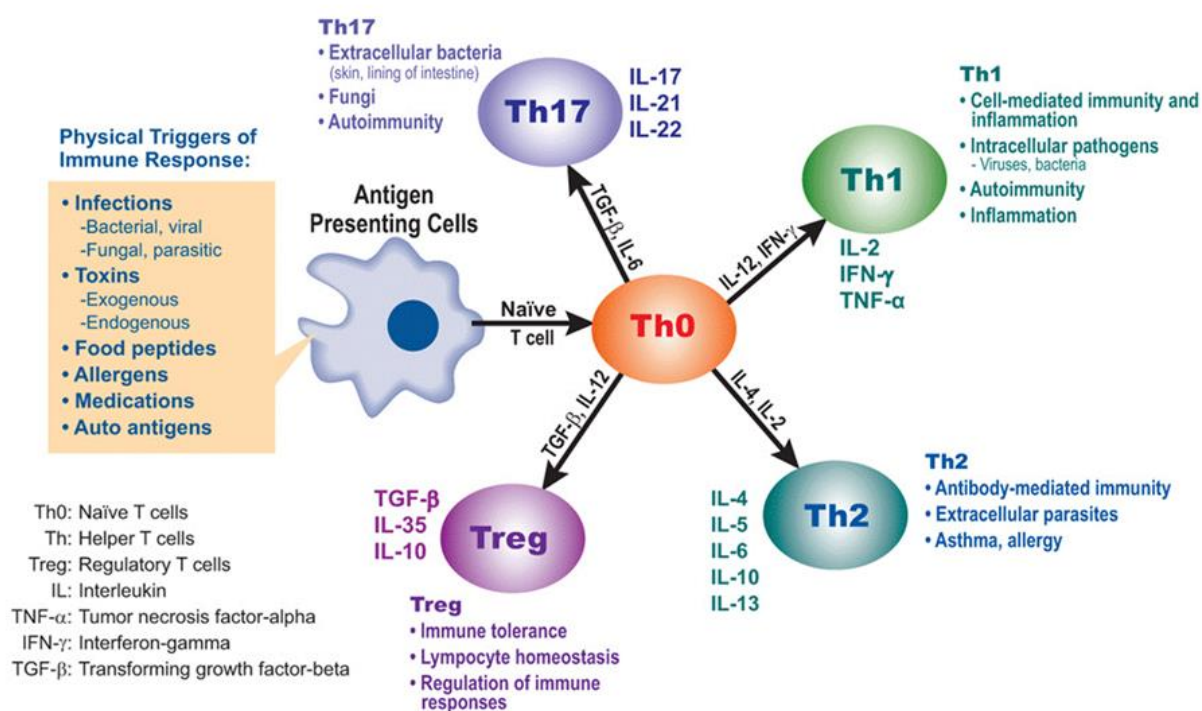


Figure 6: Polarisation des LTCD4 en fonction de l'environnement cytokinique. Quatre phénotypes distincts, Th1, Th2, Th17 et Treg sont représentés sur la base des cytokines qu'ils sécrètent. Illustration du site self hacked.

1.2.4 La délétion clonale :

La délétion clonale (figure 7), correspond à l'élimination de lymphocytes issus d'un même clone et ayant donc la même spécificité antigénique via une mort cellulaire programmée appelée apoptose [67]. Cette mort par apoptose des LT assure l'homéostasie et joue un rôle clé dans la tolérance centrale [68]. Ainsi comme nous l'avons vu en partie (1.1.1) lors de la sélection β , un thymocyte n'étant pas capable d'interagir avec un complexe CMH peptide du soi meurt par apoptose, c'est la mort par négligence. De même, lors de la sélection négative les thymocytes ayant un TCR de trop forte affinité mourront par apoptose [69]. En périphérie, il a été mis en évidence que les LT auto-réactifs ayant échappé à la

tolérance centrale peuvent également être éliminés par apoptose [70]. Cette apoptose est due à une stimulation répétée du LT auto-réactif via son TCR qui induit l'expression du complexe FAS-FASL [71]. L'expression de FAS-FASL à la surface du LT entraîne la formation intracellulaire d'un complexe d'induction de mort cellulaire en activant des protéines de la famille des caspases. Cette voie pro-apoptotique est appelée Activation-Induced Cell Death (AICD) [72]. L'importance de l'AICD dans le maintien de la tolérance au soi est mise en avant par le développement de maladies auto-immunes (lupus) chez les souris et les humains présentant une mutation dans le gène codant pour Fas [73]. Il a également été démontré par Bouillet et al [74] que d'autres voies de signalisation peuvent être impliquées dans la délétion clonale des LT. Ainsi, l'activation de Bim une protéine de la famille de Bcl-2 est nécessaire à l'homéostasie lymphocytaire et prévient le développement de maladies auto-immunes.

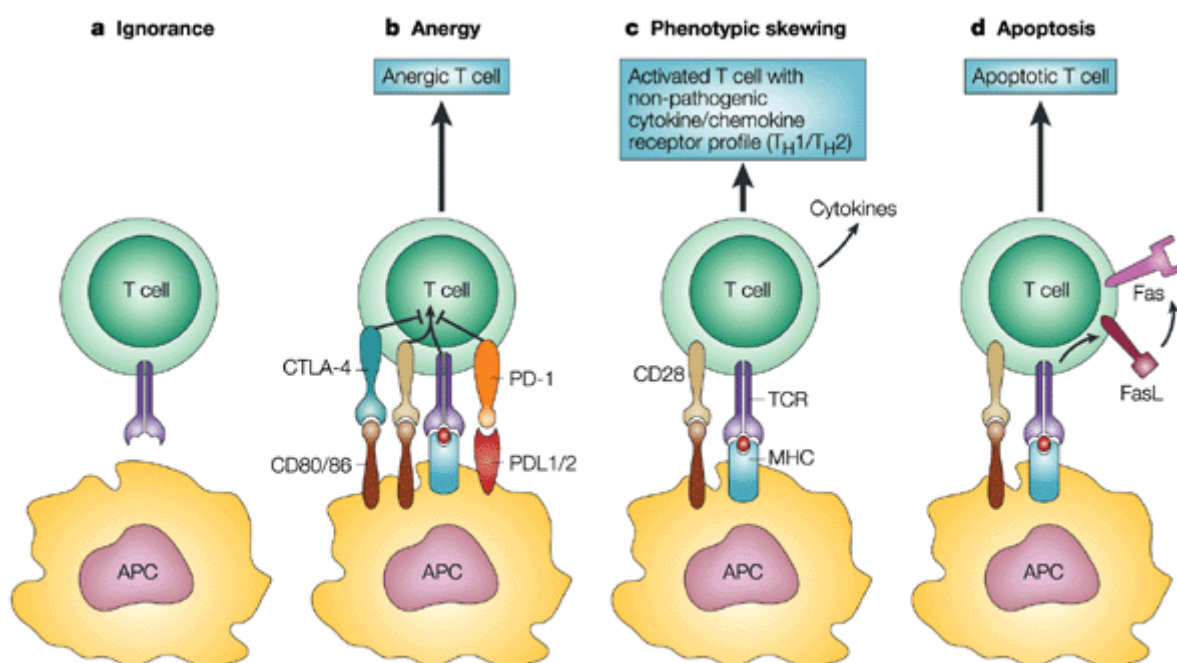


Figure 7 : Les différents mécanismes de tolérances en périphérie. En (a) le mécanisme d'ignorance, en (b) le mécanisme d'anergie, en (c) le switch phénotypique et (d) la délétion clonale. D'après [75]

1.3 Cellules impliquées dans le maintien de la tolérance périphérique :

1.3.1 Lymphocytes T régulateurs :

Deux grandes sous classes de LTreg sont à l'heure actuelle décrites :

- Les LTreg dits naturels (nLTreg) se développent dans le thymus et dérivent pour une partie d'entre eux de thymocytes ayant un TCR de forte affinité pour les peptides du soi. Les premiers à avoir été identifiés et les mieux caractérisés sont les LT CD4+CD25+FoxP3+ [76]. Ces derniers représentent 5 à 10% du répertoire des LTCD4 [77]. Plus, récemment il a été

identifié différentes sous-populations de LTreg tels que les LTreg CD8+ [78] ou encore LT double négatif CD3+CD4-CD8- [79].

-Les LTreg dits induits (iTreg) proviennent quant à eux de la différenciation de LTCD4 effecteurs en LT suppresseurs (switch phénotypique) en réponse à certaines cytokines telles que le TGF- β ou l'IL-10 [61]. Deux grands sous types de iTreg sont à ce jour décrits [80]: les iTreg produisant de l'IL-10 et n'exprimant pas le FoxP3 encore appelés Tr1, et les LTreg exprimant FoxP3.

Les lymphocytes T reg se caractérisent par leur capacité à inhiber le développement d'une réponse immunitaire[81]. Ils exercent cette fonction suppressive aux travers différents mécanismes tels que (figure 8):

-le contact cellule-cellule pouvant induire une délétion clonale ou une anergie des LT effecteurs ou encore par modulation de la fonction des CPA[82]. Ainsi, l'expression de molécule telle que CTLA-4 par les LTreg peut inhiber la capacité des CPA à activer des LT [83]. Cette inhibition peut résulter, de la diminution de l'expression de molécules de co-stimulation telles que CD80 et CD86 à la surface de CPA induisant l'anergie des LT. Elle peut également résulter de l'induction de l'expression d'une enzyme appelée indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) par les DCs, entraînant une privation de tryptophane dans le milieu indispensable à la prolifération des LT [84].

- la sécrétion de cytokines suppressives telles que l'IL-10 ou le TGF- β ou par la perturbation métabolique par sécrétion d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) un puissant inhibiteur de la prolifération cellulaire et de la sécrétion d'IL-2 par les LT [82].

Les LTreg jouent un rôle majeur dans le maintien de la tolérance au soi. En effet, il a été démontré que leur déplétion est associée au développement de maladie auto-immunes [76]. Une des hypothèses expliquant leur efficacité dans le maintien de la tolérance au soi se base sur leur réactivité vis-à-vis des antigènes du soi. En effet, comme nous l'avons vu

précédemment Picca et *al* ont mis en évidence que les LTreg proviennent en majorité de la différenciation de thymocytes SP ayant un TCR de forte affinité pour des peptides du soi. Plusieurs études viennent étayer cette hypothèse mettant en évidence que des LTreg auto-réactifs présentent des effets bénéfiques dans des modèles murins d'auto-immunités. Homann et *al* [85] décrivent que l'administration orale d'insuline induit la génération de LTreg spécifiques de la chaîne B de l'insuline. Ils mettent en évidence que le transfert de cette population de LTreg permet l'inhibition du diabète chez la souris. Quelques années plus tard Tonkin et *al* [86] démontrent que l'efficacité suppressive des LTreg est dépendante de la présence de leur antigène respectif.

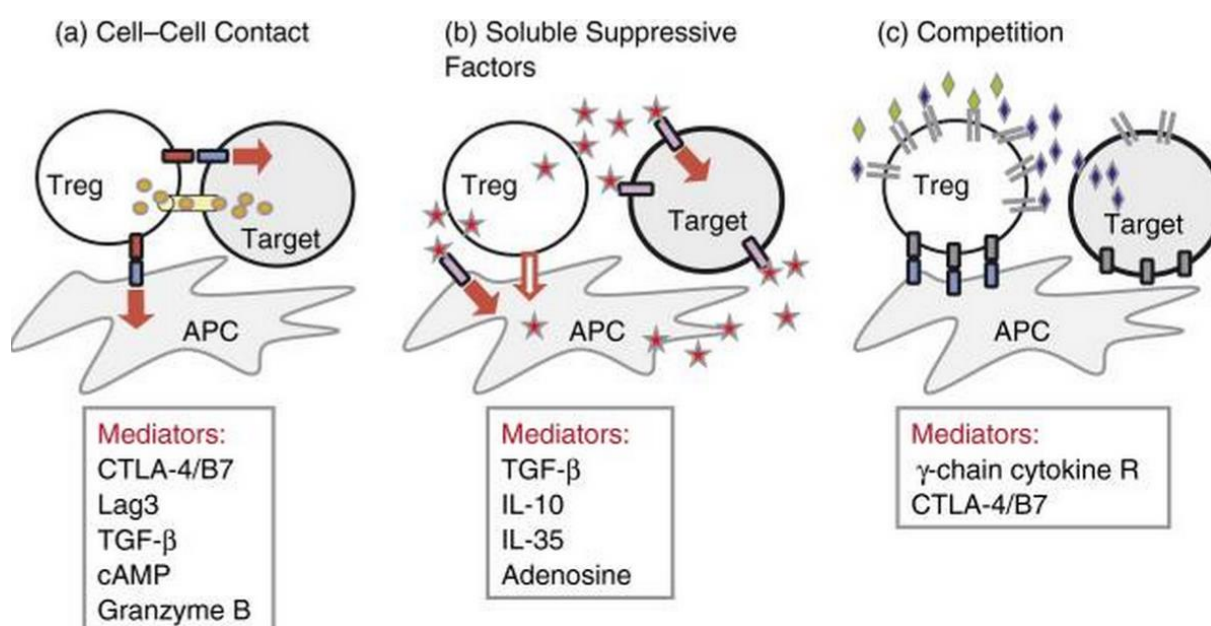


Figure 8: Les différents mécanismes suppressifs des LTreg. Trois mécanismes principaux sont décrits sur cette figure. En (a) le mécanisme de suppression dépendant du contact cellule-cellule. En (b) la sécrétion de facteur soluble par les LTreg. En (c) le mécanisme de compétition. D'après [82]

1.3.2 Cellules extra-thymiques exprimant AIRE (eTAC) :

Comme décrit précédemment, le facteur de transcription AIRE a été initialement identifié dans les mTEC où son rôle dans la tolérance centrale a clairement été démontré [34]. De façon intéressante, les premières investigations sur la localisation de l'expression de ce facteur de transcription ont révélé outre son expression dans le thymus, la présence d'ARNm codant pour AIRE au niveau des organes lymphoïdes secondaires [87]. Gardner et al [87] ont confirmé l'expression protéique de AIRE hors du thymus et ont montré son rôle dans le maintien de la tolérance périphérique. Dans cette étude, ils mettent en évidence dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions) la présence de cellules exprimant AIRE (eTAC) et de l'expression par ces cellules de TSA. De plus, ils démontrent que ces cellules interagissent de façon antigène spécifique avec des LTCD8 auto-réactifs ayant un TCR spécifique d'IGRP (islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein) auto-antigène exprimé dans le pancréas et absent du thymus. Cette interaction conduit à la délétion clonale des LTCD8 auto-réactifs. L'origine des eTAC reste à ce jour controversée. Ainsi, Gardner et al [88] ont mis en évidence que ces cellules sont d'origine hématopoïétique et qu'elles expriment de façon importante le CMH de classe II et de faibles niveaux d'expression des molécules de co-stimulation CD80 et CD86. De plus, ils détectent leur présence dans les organes lymphoïdes secondaires humains. Ils démontrent que ces cellules sont capables d'interagir avec les LTCD4 et d'inhiber leur capacité à induire un diabète, suite à un transfert adoptif dans des souris SCID. Cependant, une étude récente de Sherin et al [89] rapporte l'expression de AIRE dans des cellules endothéliales lymphatiques donc d'origine stromale. Ils démontrent que ces cellules sont capables d'induire une délétion clonale des LTCD8 de façon spécifique de l'Ag. De plus, ils démontrent que ces cellules sont capables de transférer des TSA aux DCs présents dans le ganglion ces dernières induisant l'anergie in vivo des LTCD4 auto-réactifs.

1.3.3 Cellules présentatrices d'antigènes :

Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) représentent un groupe hétérogène de cellules immunes dont la fonction est d'induire la réponse immunitaire à médiation cellulaire. Elles assurent cette fonction par l'internalisation, l'apprêtement et la présentation d'antigènes aux LT. Quatre types cellulaires ont cette capacité de présentation antigénique: les DC, les macrophages, les cellules de Langerhans et les LB. Outre leur capacité à activer les LT ces CPA ont la capacité d'inhiber de façon antigène spécifique la réponse T [90]. Dans la suite de cette partie nous nous focaliserons plus particulièrement sur les macrophages et les cellules dendritiques car ces dernières sont décrites comme des CPA professionnelles c'est-à-dire les mieux à même d'activer les LT naïfs.

1.3.3.1 Macrophages :

Découverts en 1908 par le zoologiste Elie Metchnikoff's, les macrophages sont des cellules du système immunitaire d'origine hématopoïétique [91]. Ils proviennent principalement de l'hématopoïèse embryonnaire siégeant dans le Yolk sac puis migrent vers les tissus où ils se spécialiseront en fonction de l'organe colonisé [92]. Certains macrophages dérivent quant à eux des monocytes circulants on parle de macrophages dérivés de monocyte [93]. De façon générale, les macrophages sont présents dans l'ensemble des tissus de l'organisme et permettent le maintien de l'homéostasie [94]. Ils jouent un rôle majeur dans l'immunité innée grâce à leur capacité phagocytaire et à l'expression de groupes de récepteurs appelés Pattern Recognition Receptors (PRR), capables de reconnaître des motifs moléculaires conservés chez les pathogènes (PAMP). Ils initient ainsi le processus inflammatoire nécessaire au recrutement d'autres cellules du système immunitaire. Les macrophages jouent également un rôle dans l'immunité adaptative en

activant les réponses lymphocytaires mémoires par présentation sur le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et II (CMHI et CMHII) de peptides antigéniques. Des études basées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux ont permis de mettre en évidence un fort degré d'hétérogénéité au sein de cette population [95][97]. Cette hétérogénéité est le reflet de la spécialisation de la fonction adoptée par les macrophages, en fonction de leur localisation anatomique. En effet, certains macrophages pourront jouer le rôle d'ostéoclastes dans le remodelage osseux, tandis que d'autres seront chargés de la clairance de micro-organismes, virus ou particules au niveau pulmonaire. Cette diversité peut parfois même être retrouvée au sein d'un même organe. Ainsi par exemple, dans la rate, seront présents trois grands types de macrophages [98] :

- les macrophages métallophiliques, présents à la limite entre le sinus marginal et la pulpe blanche,
- les macrophages de la zone marginale, responsables de l'élimination des pathogènes transmissibles par le sang,
- les macrophages de la pulpe rouge, qui ont une forte activité phagocytaire et chargés de l'élimination des érythrocytes sénescents.

Cette diversité se retrouve également dans le phénotype adopté par les macrophages (Tableau 1). Les macrophages ont longtemps été caractérisés par l'expression de certains marqueurs comme le F4.80, le CD11b, CMHII chez la souris ou encore le CD68 chez l'homme [99]. Cependant, ces marqueurs ne sont pas exclusifs des macrophages et sont aussi présents chez certaines populations de cellules dendritiques [100]. Ce chevauchement de phénotype concerne surtout les macrophages et les DC dérivées de monocytes. Afin de contourner ce problème, une nouvelle nomenclature a été proposée par Williams et *al*, et basée sur la prise en compte dans un premier temps, de l'ontogénie de la cellule étudiée puis dans un second temps, de la localisation, fonction et phénotype.

Table 1: The specific phenotype of mouse macrophages from different sites

Surface marker	Peritoneal macrophage	Interstitial macrophage	Alveolar macrophage
CD11b	Intermediate expression	Intermediate expression	Not expressed
CD11c	Not expressed	Not expressed	High expression
CD14	Intermediate expression	Intermediate expression	Low expression
CD200R	Low expression*	Intermediate expression	High expression
DEC205	Not expressed	Expression unknown	Intermediate expression
F4/80	Intermediate expression	Low expression	Low expression
Mannose receptor (also known as CD206)	Low expression	Intermediate expression	High expression
MHC class II	Intermediate expression	Intermediate expression	Low expression
SIGLEC-F	Not expressed	Not expressed	High expression

Tableau 1: Phénotype des macrophages selon leur localisation tissulaire chez la souris. D'après [101]

1.3.3.1.1 Les macrophages M1 et M2 :

Du fait de l'absence de réel marqueur exclusif des macrophages, ils ont été caractérisés sur la base de profils d'expression génique après stimulation cytokiniques ou microbienne [102]. Il a été identifié des macrophages ayant des propriétés plutôt pro-inflammatoires, qualifiés de M1, et des macrophages aux propriétés anti-inflammatoires qualifiés de M2 (figure 9). Classiquement, les macrophages M1 activés sont différenciés par leur capacité à sécréter des cytokines inflammatoires de type I (TNF- α , IL-1 β ...), jouant un rôle dans l'élimination de microorganismes et de cellules tumorales. Ils sont aussi connus pour exprimer de nombreux TLR et récepteurs d'opsonisation. Les macrophages M2, quant à eux, sécrètent de faibles doses d'IL-12 et sont divisés en trois sous types [103] :

- les M2a induits par l'IL-4, l'IL-23 et IL-21,
- les M2b induits par des complexes immuns et des agonistes de Toll Like Receptors (TLR),
- les M2c induits par l'IL-10, le TGF- β et les glucocorticoïdes.

Les macrophages de type M2 sont caractérisés par une forte expression de récepteurs non opsonisant comme le récepteur au mannose CD206.

Certaines études se sont attachées à mettre en évidence des marqueurs biologiques permettant de distinguer les macrophages de type M1 des M2. Ainsi, le récepteur beta au folate a été identifié chez des macrophages infiltrant de tumeur(TAM) comme marqueur des macrophages de type M2. Chez la souris, les marqueurs conventionnels des macrophages de types M2 sont l'Arginase-1, Fizz-1, Ym1 et MRC1 [104]. Chez l'homme, les marqueurs peuvent différer ainsi le CD163, CD206, DECTIN-1 ou les chemokines CCL16, CCL17 ou encore CCL18 sont exprimés par les macrophages de type M2. Dans la suite de cette partie nous nous consacrerons au potentiel tolérogène de macrophage de type M2 et leur rôle dans le maintien de la tolérance au soi.

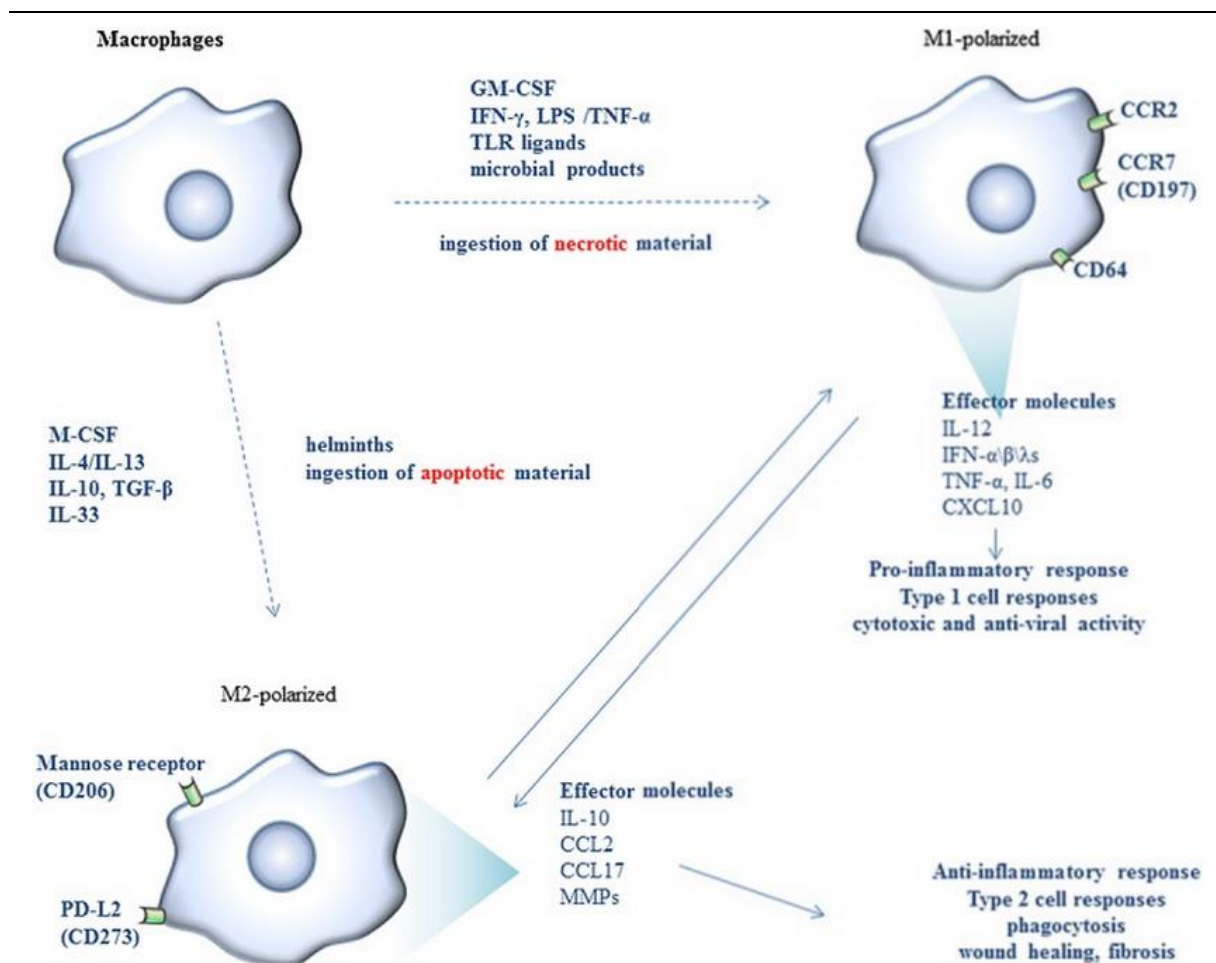


Figure 9: Polarisation et phénotype des macrophages M1 et M2. D'après [105]

1.3.3.1.2 Les macrophages tolérogènes :

Le rôle des macrophages dans le maintien de la tolérance périphérique n'est pas totalement élucidé mais il repose principalement sur la capacité des macrophages à internaliser des corps apoptotiques [106]. En effet, il a été démontré que l'administration de cellules apoptotiques (provenant du mâle) chez la souris permet l'induction d'une tolérance de greffe de peau à antigènes mineurs (mâle sur femelle). Cette tolérance est dépendante de la sécrétion de CCL22 par les macrophages métallophiliques de la rate permettant le recrutement de LTreg et de DC tolérogènes. Il a également été démontré que ces macrophages exprimant le CD169 contrôlent l'accès des exosomes (vesicule formé à partir

de l'endosome tardif) source d'auto-antigènes au niveau de la rate et des ganglions lymphatiques [107]. Par cette action les macrophages diminuent la probabilité que ces auto-antigènes ne soient présentés par les DCs au niveau des organes lymphoïdes secondaires et induisent une réponse auto-immune. Cependant, l'absence de CD169 chez la souris n'est pas associée au développement de maladie auto-immune suggérant un rôle secondaire de ce phénomène dans le maintien de la tolérance au soi [108]. Outre le rôle des macrophages dans le maintien de la tolérance périphérique les macrophages présentent des propriétés tolérogènes ayant un rôle important dans la tolérance vis-à-vis d'antigènes alimentaires [109]. Hadis et al [109] ont mis en évidence chez des souris gavées par administration intragastrique d'OVA que la délétion de macrophages dérivés de monocytes de la *lamina propria* exprimant CX3CR1 est associée à un défaut de tolérance vis-à-vis de l'OVA. En effet, les souris CX3CR1^{-/-} présentent une réaction lymphocytaire vis-à-vis de l'OVA significativement augmentée, mesurée par d'une réaction d'hypersensibilité retardée (DTH). Ce défaut de tolérance vis-à-vis de l'OVA est associé à une diminution significative des macrophages exprimant l'IL-10, conduisant à un défaut de recrutement de LTreg au niveau de la *lamina propria*. Cependant, l'expression du CXCR1, marqueur également présent chez les DC, rend difficile de conclure que la tolérance observée est bien médiée par des macrophages.

1.3.3.2 Cellules dendritiques :

Découvertes à la fin des années 1970 par Ralph Steinman et Zanvil Cohn les DCs sont des cellules d'origines hématopoïétiques. Elles se caractérisent par une morphologie formée de dendrites ainsi que par une forte expression de molécules de CMH de classe II à leur surface. De plus, elles sont spécialisées dans la capacité à stimuler des lymphocytes T naïfs, c'est pourquoi elles sont parfois appelées CPA professionnelles [110]. Parmi les DCs, il existe une diversité de lignées (voie de différenciation), une diversité anatomique, de

stades de maturation et de fonctionnalités [111]. Elles sont localisées dans la quasi-totalité des tissus non-lymphoïdes et lymphoïdes de l'organisme [112]. A l'état basal elles sont qualifiées d'immatures et possèdent une forte capacité d'internalisation des antigènes (phagocytose, endocytose) et une faible expression de molécules de CMHII [113]. Les DC au même titre que les macrophages expriment des PRR leur permettant de détecter des motifs moléculaires conservés exprimés par des pathogènes via les PAMPs et les signaux de dangers via les DAMPs. Cette reconnaissance induit l'activation de la cellule dendritique conduisant à sa maturation. Cette maturation est associée à une augmentation de l'expression de molécules de CMHI et CMHII (signal 1), de molécules de co-stimulations (signal 2) et de la sécrétion de cytokines (signal 3) permettant une activation optimale des LT naïfs [113].

1.3.3.2.1 Les différentes sous populations de cellules dendritiques :

Chez la souris trois grandes classes de cellules dendritiques (figure 10) ont été décrites[111], les DC plasmacytoides (pDC), les DC dites conventionnelles (cDC) et les DC dérivées de monocytes (moDC). Ces trois grandes classes proviennent de la différenciation d'un progéniteur myéloïde commun (figure 11) [114]. Les pDC représentent un sous ensemble de DCs qui se différencient des cDC et des moDC par leur capacité à produire de l'IFN de type I en réponse à une infection virale [115]. Les cDC dérivent comme les pDC d'un précurseur hématopoïétique commun (pré-DC) mais ne semblent pas en mesure de produire de l'IFN de type I. Elles peuvent être classées en deux grandes catégories [111] que sont : les DC dites résidentes, qui sont présentes en permanence dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques) et les DC dites migratoires localisées dans les organes non lymphoïdes (ex : peau, poumon, rein...) qui migrent des tissus vers les ganglions lymphatiques drainants. Parmi les DC résidentes, deux phénotypes principaux sont identifiés chez la souris : les CD11b-CD8+ [116], capable de présenter des peptides exogènes sur leurs molécules du CMHI par cross présentation et les CD11b+CD8- activant

préférentiellement les LTCD4 naïfs. Parmi les DC migratoires, deux phénotypes principaux sont également identifiés chez la souris : les CD11b⁻ CD103⁺ qui à l'instar des DC CD8⁺ cross présentent les antigènes qu'elles internalisent et les CD11b⁺. Chez l'homme l'existence de DC résidentes et migratoires est moins bien défini, cependant une étude de Segura et al [117] a mis en évidence l'existence de deux sous population de DC présentes dans les ganglions la rate et les amygdales ainsi que l'existence de trois populations distinctes de DC migrantes de la peau sur la base d'un phénotypage complexe. La troisième grande classe de DC correspond aux cellules dendritiques dérivées de monocytes également appelées Tip-DC [118]. Ces dernières par leur origine monocyttaire présentent des différences phénotypiques et fonctionnelles que nous détaillerons dans la partie (1.3.3.2.4).

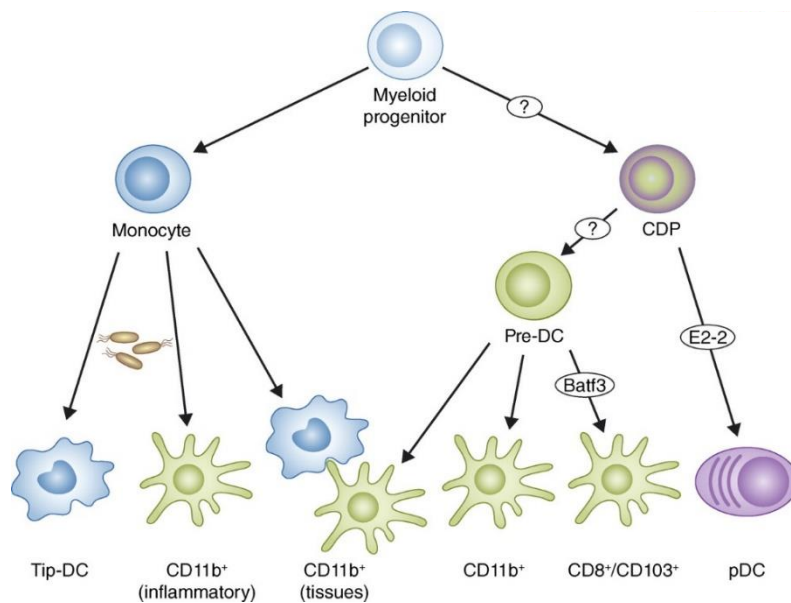


Figure 10: Ontogénie des cellules dendritiques chez la souris. Les DC dérivent d'un progéniteur myéloïde commun puis se différencient en trois grands sous types que sont les cDC en vert, les pDC en violet et les DC dérivées de monocytes en bleu. D'après [119]

1.3.3.2.2 Maturation des cellules dendritiques :

La maturation des DC est un processus complexe caractérisé par l'acquisition de nombreuses propriétés fondamentales telles que l'apprêtement et la présentation antigénique, la migration et la stimulation des LT naifs [120]. A l'état basale, les DCs sont qualifiées d'immatures et caractérisées par une faible expression de molécules du CMHII et de co-stimulations telles que CD80, CD86 ou encore CD40 [120]. De façon constante, elles internalisent des antigènes disponibles dans l'environnement par l'intermédiaire de récepteurs tels que DEC 205 ou le récepteur au mannose CD206 et les présentent sur le CMH de classe II et par cross présentation sur le CMH de classe I [7]. Lors d'une infection par un pathogène ou un traumatisme mécanique les DCs reconnaîtront les PAMP ou des signaux de danger (DAMP) par l'intermédiaire des PRR [120]. Ces PRR regroupent de nombreuses familles de protéines telles que les « Toll-like receptors » (TLR) exprimés à la surface des DC ou encore les NOD-Like Receptors (NLR) [121] présents dans le cytoplasme, ou encore d'autres récepteurs tels que les C-type Lectin Receptors (CLR) [121] ou les RIG-I-like Receptors (RLR) [120]. Les TLR sont les récepteurs les mieux caractérisés, à ce jour 12 membres de TLR sont identifiés [122]. De TLR1 à TLR12 (Tableau 2) chacun reconnaissant des motifs moléculaires variés issues de bactéries, virus et parasites. A titre d'exemple le TLR4 reconnaîtra des peptides microbiens tels que le lipopolysaccharides (LPS) quand le TLR9 reconnaîtra l'ADN de virus [122]. L'expression de TLR varie en fonction des sous-types de cellules dendritiques. Ainsi les pDC, spécialisées dans la réponse anti-virale exprimeront les TLR7 et 9 impliqués dans la reconnaissance d'ADN virale alors que des cDC CD11b+CD103- [123] impliquées dans l'élimination des bactéries exprimeront le TLR5 reconnaissant la flagelline exprimée par certaines bactéries (ex : *Salmonella typhimurium*). La fixation de ces PAMP ou DAMP sur les PRR induit l'activation de voies de signalisations intracellulaires telles que la voie de signalisation Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) ou la voie Nuclear Factor Kappa B (NF-κB) conduisant à la maturation de la cellule dendritique [124] Ce processus de maturation entraîne une surexpression des molécules de

co-stimulation telles CD80 CD86 et CD40 et l'augmentation de l'expression du CMHII. Ces modifications phénotypiques s'accompagnent d'une augmentation de l'expression de CCR7 permettant la migration de la DC vers une zone riche en LT naïfs dans le ganglion drainant avoisinant [125]. A ce niveau, la DC présentera des peptides dérivés du pathogène internalisé associé aux CMHI et CMHII induisant respectivement l'activation des LTCD8 et LTCD4 naïfs. L'activation d'un LT naïf par une DC mature requiert trois signaux (figure 11) [11]. Le signal 1 correspondant à l'interaction TCR CMH peptide. Le signal 2 correspondant aux signaux de co-stimulation. Il existe trois grandes familles de molécules de costimulations :

- la super famille des récepteurs au TNF tel que le CD40 exprimé par la DC et CD40L exprimé par le LT [126].

- la superfamille des immunoglobulines comme le CD28 exprimé par le LT [126]. Ces derniers se fixent aux membres de la famille B7 exprimés par les DC que sont le CD80 et CD86.

- la famille des TIM (T cell Ig and Mucin containing domain) exprimés par les LT et les DC [127].

Le signal 3 est quant à lui induit par les cytokines sécrétées par la DC. Comme nous l'avons vu la modulation de ces signaux (affinité TCR-CMHpeptide, présence au non de molécules de co-stimulation ou encore environnement cytokiniques) sont autant de variables d'ajustement permettant de contrôler la réponse T.

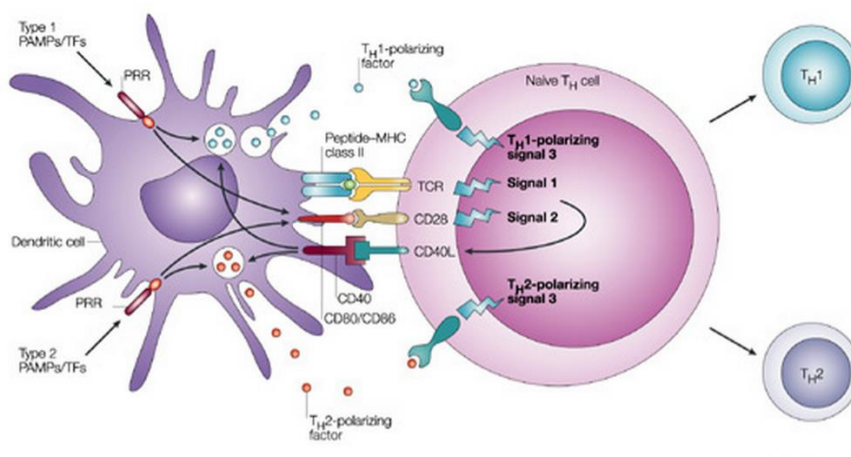


Figure 11: Activation d'un LT par une cellule dendritique. Représentation schématique des trois signaux nécessaires à l'activation d'un LT. D'après [11]

Table 1.

TLR Recognition of Microbial Components

Microbial Components	Species	TLR Usage
Bacteria		
LPS	Gram-negative bacteria	TLR4
Diacyl lipopeptides	<i>Mycoplasma</i>	TLR6/TLR2
Triacyl lipopeptides	Bacteria and mycobacteria	TLR1/TLR2
LTA	Group B <i>Streptococcus</i>	TLR6/TLR2
PG	Gram-positive bacteria	TLR2
Porins	<i>Neisseria</i>	TLR2
Lipoarabinomannan	Mycobacteria	TLR2
Flagellin	Flagellated bacteria	TLR5
CpG-DNA	Bacteria and mycobacteria	TLR9
ND	Uropathogenic bacteria	TLR11
Fungus		
Zymosan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TLR6/TLR2
Phospholipomannan	<i>Candida albicans</i>	TLR2
Mannan	<i>Candida albicans</i>	TLR4
Glucuronoxylomannan	<i>Cryptococcus neoformans</i>	TLR2 and TLR4
Parasites		
tGPI-mutin	<i>Trypanosoma</i>	TLR2
Glycoinositolphospholipids	<i>Trypanosoma</i>	TLR4
Hemozoin	<i>Plasmodium</i>	TLR9
Profilin-like molecule	<i>Toxoplasma gondii</i>	TLR11
Viruses		
DNA	Viruses	TLR9
dsRNA	Viruses	TLR3
ssRNA	RNA viruses	TLR7 and TLR8
Envelope proteins	RSV, MMTV	TLR4
Hemagglutinin protein	Measles virus	TLR2
ND	HCMV, HSV1	TLR2
Host		
Heat-shock protein 60, 70		TLR4
Fibrinogen		TLR4

Tableau 2 : Les différents TLR et leurs ligands respectifs. D'après [122]

1.3.3.2.3 Les cellules dendritiques de l'immunité à la tolérance :

Outre le rôle clé des DCs dans l'activation de la réponse immunitaire adaptative de nombreuses études ont mis en évidence leurs potentielles tolérogènes (figure 12) [128]. Ces propriétés tolérogènes comme nous allons le voir à présent sont dépendantes de plusieurs facteurs :

Un des premiers facteurs repose sur l'état de maturation des DC. De façon générale, les DC immatures sont décrites comme tolérogènes [7]. Ces propriétés tolérogènes sont associées à un faible niveau d'expression des molécules de co-stimulation tel CD80, CD86 ou encore CD40 nécessaires à l'activation des LT. En effet, Hawiger et al [7] ont mis en évidence que l'administration d'un antigène (lysozyme) couplé avec un anticorps spécifique de DEC 205 permettant de cibler les DC immatures chez des souris non immunisées est associée à une délétion clonale et une anergie *in vivo* des LTCD4 spécifiques de l'antigène. Cette tolérance n'est pas observée si les souris sont immunisées au préalable, mettant en avant le rôle des DC immatures dans ce phénomène. Peu de temps après Belz et al [129] mettent en évidence chez la souris que des DC CD8+ immatures de la rate sont capables d'induire une délétion clonale des LTCD8 par cross présentation. Cependant le dogme définissant une DC immature comme tolérogène et une DC mature comme immunogène est remis en question. En effet, il a ainsi été démontré que le transfert de DCs présentant un phénotype mature après altération de leur adhésion avec E-cadhérine inhibe le développement de l'EAE en induisant une anergie et une délétion clonale des LTCD4 de façon antigène spécifique [130]

L'environnement dans lequel se situe la DC influence également sa fonction. En effet, l'exposition à des substances anti-inflammatoires telles que le TGF- β ou encore le M-CSF est associée à la génération de DC tolérogènes pouvant induire l'anergie des LT [131]. Il a ainsi été démontré que des cytokines telles que le TGF- β ou encore le M-CSF présent dans la rate et le foie sont impliquées dans l'induction de DC CD11b+ régulatrices à l'état basal. Leur fonction suppressive varie en fonction de leur localisation anatomique ainsi les DC

CD11b+ immatures de la rate inhibent la prolifération des LT par la sécrétion d'oxyde nitrique (NO) tandis que les DC du foie sécrètent de la prostaglandine E2. Il a également été démontré que des DC exposées à des agents immunosuppresseurs chimiques tels les corticostéroïdes [132] et la rapamycine [133] deviennent tolérogènes. Les mécanismes d'actions par lesquels ces agents confèrent des propriétés tolérogènes au DC est dépendant de l'agent utilisé. Il a été démontré que le dexamthasone (corticostéroïde) [134] inhibe la différenciation *in vitro* des monocytes humains induits par le GM-CSF et l'IL-4 en DC dérivées de monocytes (moDC). En effet, l'ajout de dexamthasone est associé à la génération de moDC exprimant de faibles niveaux de molécules de costimulation (CD40,CD86) ainsi qu'une augmentation des molécules impliquées dans l'internalisation des antigènes (recepteur au mannose humain CD32) caractéristique de DC immatures. La rapamycine quant à elle n'affecte pas la maturation des DC [133] mais inhibe la capacité de ces dernières à internaliser l'antigène. Ainsi, des monocytes humains traités avec du GM-CSF et de l'IL-4 en présence de rapamycine peuvent se différencier en moDC exprimant de forts niveaux de CD80 et CD86 mais avec une capacité d'internalisation de l'antigène diminuée comparée aux moDC générées sans rapamycine.

Les DC peuvent également inhiber l'activation des LT par l'intermédiaire de nombreux médiateurs solubles [135] (figure 12) tels que le NO, le monoxyde de carbone (CO), PGE2, l'IL-10 ou le TGF- β pouvant induire le recrutement de LTreg ou encore via des enzymes comme l'hème-oxygénase 1 dont nous détaillons le rôle dans les DC en partie (3.3.2.3) et IDO [84]. Il a ainsi été démontré que l'expression d'IDO dans les DC induit une privation de tryptophane dans le milieu indispensable à la prolifération de LT. L'utilisation d'un inhibiteur de l'activité d'IDO le 1-MT est associée à une exacerbation des symptômes dans des modèles expérimentaux d'auto-immunité [136].

Bien qu'ayant des propriétés tolérogènes démontrées, le rôle des DCs dans le maintien de la tolérance périphérique n'est pas complètement élucidé. L'hypothèse

principale repose comme pour les macrophages, sur l'internalisation de corps apoptotiques issus de tissu périphérique qui une fois internalisés par les DCs immatures seraient présentés dans le ganglion drainant, induisant une délétion clonale des LT auto-réactifs [137]. De plus, il a été démontré que l'internalisation de corps apoptotiques par des DCs entraîne la sécrétion de TGF- β induisant la génération de LTreg [138]. Le rôle des DCs dans le maintien de la tolérance périphérique a été renforcé par l'étude de Ohnmacht et *al*, dans laquelle il démontre que la délétion constitutive des DCs chez la souris est associée au développement d'une réaction auto-immune létale [139]. Cependant, l'étude de Birnberg et *al* démontre que la délétion des cDCs n'est pas associée au développement de réaction auto-immune, suggérant un rôle prépondérant des pDCs et des moDC dans le maintien de la tolérance périphérique [140]. L'ensemble de ces études mettent en évidence le caractère plastique des DC qui selon les signaux qu'elles auront intégrés pourront induire une réponse immunitaire ou à l'inverse l'inhiber. Ainsi, dans la suite de cette partie nous présenterons les cellules dendritiques dérivées de monocytes classiquement présentés comme pro-immunogènes nous avons pu au travers de notre étude mettre en évidence que dans certaines conditions ces dernières peuvent présenter des propriétés tolérogènes (cf résultat).

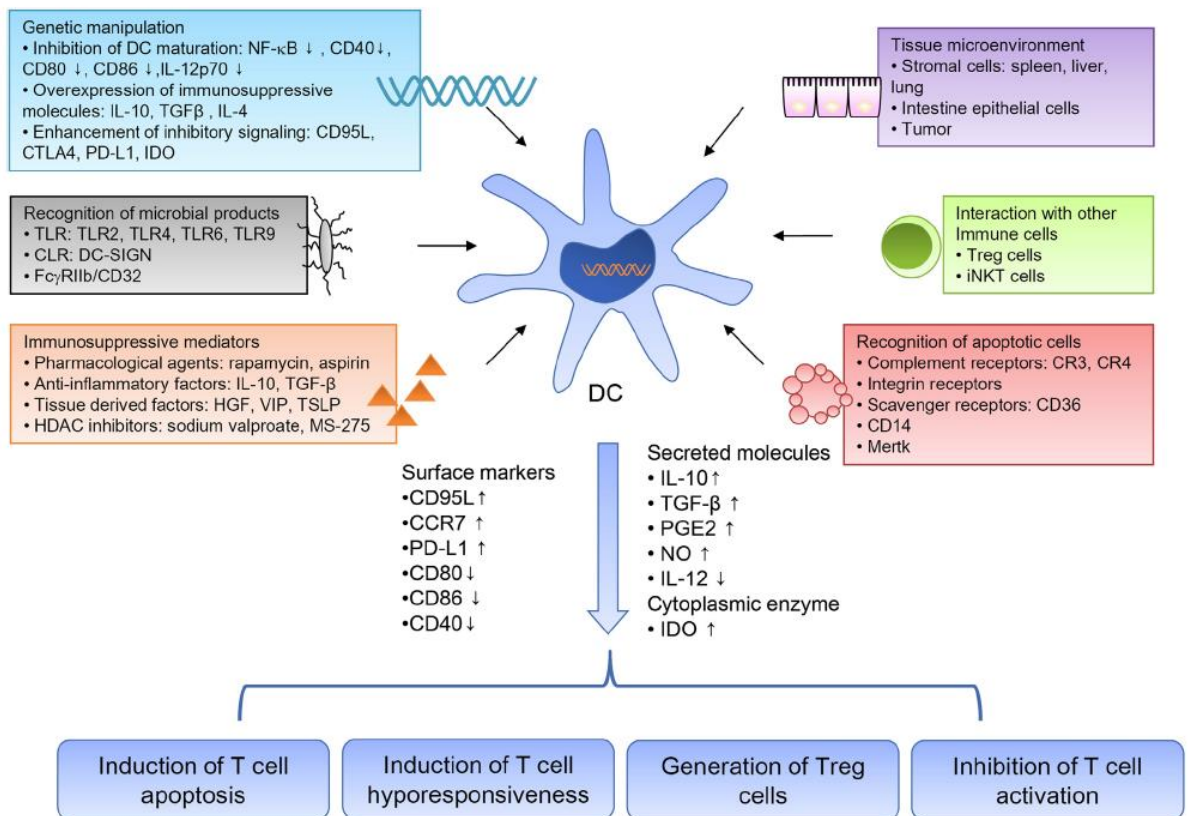


Figure 12: Facteurs favorisant la génération de cellules dendritiques tolérogènes. L'environnement tissulaire (encadré violet), l'interaction avec d'autres cellules immunitaires (encadré vert), les agents immunosuppresseurs (encadré orange), les composants microbiens (encadré noir), la reconnaissance de corps apoptotiques (encadré rouge) et les manipulations génétiques (encadré bleu) sont autant de facteurs pouvant induire des DC tolérogènes. D'après [141]

1.3.3.2.4 Les cellules dendritiques dérivées de monocytes :

Chez la souris les moDC ou encore appelées DC inflammatoires ou Tip-DC ont été identifiées pour la première fois par l'étude de Léon et al [142]. Suite à une infection par *Leishmania major*, ils ont observé un fort recrutement de DC au niveau du ganglion drainant. Ils établissent un premier phénotypage mettant en évidence que ces cellules expriment le CD11c^{low} ainsi que le CMHII^{int} et le Ly6C^{hi}. Suite à cette découverte de nombreuses études

ont montré chez la souris l'existence d'une population cellulaire possédant un phénotype similaire suite à l'induction d'une inflammation soit dépendante de pathogènes tels que des bactéries (*Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*) [143] des virus (Herpès virus de la grippe) [144] ou encore des levures [145]. Outre l'expression du CMHII, Ly6C et CD11c les moDC se caractérisent par l'expression de deux marqueurs macrophagiques le CD206 et le CD64. Ainsi, elles ne peuvent pas être différenciées des macrophages sur la base de ces seuls marqueurs. Une étude récente de Plantinga et al [146] a montré que l'expression du récepteur FcεR1 (récepteur au fragment Fc d'IgG) est à l'heure actuelle l'un des seuls marqueurs permettant de discriminer les macrophages des moDC (Tableau 3).

Une des caractéristiques permettant de distinguer les moDC des cDC est leur origine [142]. En effet, les moDC se différencient *in situ* à partir des monocytes recrutés au niveau du site de l'inflammation et non via des précurseurs pré-DC comme les cDC. Il a ainsi été démontré que des monocytes injectés dans des souris se différencient en moDC. L'origine monocyttaire de ces cellules est confirmée par leur absence suite à une infection par le virus de la grippe influenza dans des souris CCR2 KO [147]. De plus, l'absence de Flt3 récepteur indispensable au développement des cDC n'affecte pas la formation de moDC [146]. A ce jour, le mécanisme moléculaire impliqué dans la différenciation des monocytes en moDC reste mal connu. Il a cependant été mis en évidence que le récepteur M-CSF est nécessaire à cette différenciation mais ne joue pas de rôle dans la phase de recrutement [143]. Chez l'homme la capacité de différenciation *in vitro* des monocytes en cellules dendritiques est connue depuis une vingtaine d'années [148]. Cependant, ce n'est que récemment qu'il a été identifié *in vivo* dans des liquides d'ascites associées à des tumeurs des moDCs présentant un phénotype distinct des macrophages et cDC [149]. Les moDC humaines sont caractérisées par l'expression du CMHII (HLA-DR), CD11c, BDCA1, CD1a, FcεR1 et comme chez la souris, par des molécules habituellement présentes sur les macrophages telles que CD206 et CD14 [149][150].

	DC res CD8 ⁺	DC res CD11b ⁺	DC mig CD103 ⁺	DC mig CD11b ⁺	DC inf	Macro- phage
CD11b	-	+	-	+	+	+
Ly6C	-	-	-	-	+	+
CD206	-	-	-	+	+	+
FcεRI	-	-	-	-	+	-
CD64	-	-	-	-	+	++
CD11c	++	++	++	++	+	+/-
CMH II	+	+	++	++	+	+/-

Tableau 3: Phénotype comparatif des macrophages et cellules dendritiques dérivées de monocytes chez la souris. D'après [151]

1.3.3.2.5 L'activation des LT par les moDC :

Les moDC et les cDC partagent de nombreuses caractéristiques pour l'activation et la polarisation d'une réponse lymphocytaire, il a été démontré que des moDCs isolées de ganglions sont en mesure d'activer *ex vivo* des LTCD4 de manière antigène spécifique. La polarisation des LTCD4 en Th1/Th2 par les moDCs est influencée par l'environnement inflammatoire. Il a ainsi été démontré que le moDC induites par à une infection à *Leishmania major* induit une polarisation de type Th1 [142]. A l'inverse, dans un modèle d'asthme le recrutement des moDC est associé à une différenciation de type Th2 [146]. Tout comme les cDC, les moDC sont capables de présenter des antigènes exogènes sur leur molécule de CMHI, un processus appelé cross-présentation [152]. Toutefois, le mécanisme de cross-présentation par les moDC diffère de celui des cDC CD8⁺ résidentes [153]. En effet, il a été démontré que l'absence du récepteur au mannose et d'une aminopeptidase (IRAP) empêche la cross-présentation uniquement des moDC sans affecter celle des cDC CD8⁺ résidentes.

De façon intéressante, les moDC sont capables d'internaliser des antigènes sur le site de l'inflammation puis migrer dans le ganglion [154] mais possèdent aussi la capacité de présenter des antigènes en périphérie contrairement au cDC résidentes. En effet, il a été démontré que suite à une infection par HSV-1 les moDC induites stimulent les LTCD8 et LTCD4 mémoires présents dans les tissus [155]. Une étude récente de Ohyagi et al [156] a mis en évidence que les moDCs sont impliquées dans l'internalisation des érythrocytes dégradés par une infection au LCMV. Cette internalisation est associée à la sécrétion d'IL-10 permettant de modérer la réponse immune protégeant l'organisme en cas d'infection sévère. Comme nous le verrons en partie (3.1) les érythrocytes sont riches en hème, molécule induisant l'expression de l'enzyme hème-oxygénase-1. De façon intéressante au cours de notre étude (cf résultats), nous avons démontré que les moDCs exprimant l'HO-1 acquièrent des propriétés suppressives.

1.4 Rupture de tolérance et auto-immunité :

L'ensemble de ces cellules régulatrices que sont les eTAC, les LTreg ou encore les CPA permettent ainsi de préserver l'intégrité de l'organisme contre une réponse immunitaire contre le soi. Cependant, dans certains cas, un ou plusieurs de ces mécanismes sont défaillants entraînant une rupture de tolérance vis-à-vis du soi. Cette rupture de tolérance conduit au développement de maladies auto-immunes. Ces maladies affectent 10% de la population à travers le monde représentant un enjeu de santé publique majeur [157]. Certaines de ces maladies sont d'origines connues comme la polyendocrinopathie auto-immune de type 1 (ASP-1) liée à une mutation du gène codant pour le facteur de transcription AIRE ou encore le syndrome d'immuno-dérégulation, polyendocrinopathie, entéropathie auto-immune lié au chromosome X (IPEX) associé à une mutation du gène codant pour le facteur de transcription FoxP3. Cependant,

de nombreuses maladies auto-immunes restent à ce jour idiopathiques comme le cas du diabète de type 1 (DT1) et de la sclérose en plaques (SEP) que nous développerons dans la suite de cette partie. L'environnement, la génétique et la dérégulation du SI semblent être les trois principaux facteurs influençant le développement de ces maladies (figure 13).

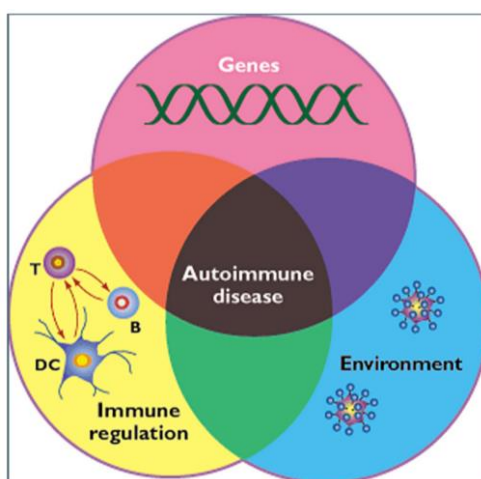


Figure 13: Facteurs extrinsèques et intrinsèques favorisant le développement de maladies auto-immunes idiopathiques. D'après [158]

1.4.1 Le diabète de type 1 :

Le diabète de type 1 (DT1), se caractérise par une rupture de tolérance du système immunitaire vis-à-vis d'auto-antigènes (ex : GAD65 « glutamic acid decarboxylase », l'insuline ou IGRP exprimés par les cellules β des îlots du pancréas [8]. Cette rupture de tolérance conduit au développement d'une réaction immunitaire contre ces cellules β entraînant leur destruction. La disparition de ces cellules productrices d'insuline, seule hormone hypoglycémiante, conduit à une hyperglycémie chronique délétère pour l'organisme.

1.4.1.1 Epidémiologie :

Le DT1 peut être diagnostiqué à n'importe quel âge, cependant le plus grand nombre de cas détectés se produit entre 5 et 7 ans. L'incidence du DT1 varie en fonction des saisons et du mois de naissance. Ainsi, des personnes nées au printemps présentent un risque plus important de développer le DT1 [159]. De même, l'apparition des premiers auto-anticorps dirigés contre les îlots du pancréas dans les mois ou années précédant l'apparition des premiers symptômes présente un lien avec la saison [160]. Ces concepts supportent le rôle théorique de l'environnement sur l'initiation et le développement du processus pathologique dans le DT1. Un grand nombre de facteurs environnementaux influençant l'épidémiologie du DT1 ont été évalués tels que la vitamine D, la diététique [161], le microbiote intestinal [162] ou encore les infections virales [163]. Cependant, aucun de ces facteurs n'induit de façon certaine le développement du DT1. Outre l'environnement, certaines études ont mis en évidence des facteurs génétiques pouvant induire une prédisposition ou une résistance au développement du DT1. Ces facteurs génétiques concernent principalement les gènes du CMH de classe II chez l'homme appelé HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR. Ainsi, les personnes d'haplotypes HLA DRB1*0401-DQB1*0302 et DRB1*0301-DQB1*0201 présentent une susceptibilité accrue au développement du DT1. A l'inverse les personnes d'haplotypes DRB1*1501 and DQA1*0102-DQB1*0602 présentent une résistance au développement du DT1 [164]. L'incidence (rapportant le nombre de nouveaux cas d'une pathologie observés pendant une période donnée) et la prévalence (la proportion d'individus de la population ayant contracté la maladie) est variable en fonction de la région du globe. A titre d'exemple en France l'incidence du DT1 en 2014 est de 13.5 cas pour 100 000 personnes contre 65 cas pour 100 000 personnes en Finlande. De façon générale l'incidence du DT1 est en constante augmentation dans le monde depuis ces 10 dernières années [165]. Malgré l'ensemble de ces études le DT1 reste une maladie idiopathique. Afin de développer des stratégies thérapeutiques de nombreuses équipes de recherches se sont intéressées à comprendre la physiopathologie de cette maladie.

1.4.1.2 Physiopathologie :

L'étude de la physiopathologie du DT1 présente certaines difficultés principalement liées au fait que les évènements immunologiques se mettent en place bien avant la phase de diagnostic de la maladie. Ainsi, de nombreuses connaissances proviennent de modèles animaux tels que la souris NOD ou le rat BB. Ces animaux développent spontanément le DT1 et partagent des caractéristiques communes avec l'homme tels que des gènes de susceptibilité ou de résistance au développement de la maladie [166]. Le développement du DT1 nécessite une réponse immunitaire dirigée contre les auto-antigènes des cellules β . Cette réponse immunitaire doit présenter un caractère pro-inflammatoire important associé à un défaut des mécanismes de tolérances périphériques permettant à la réponse immunitaire de devenir chronique. Plusieurs hypothèses sont proposées pour expliquer l'initiation de la réponse immune contre les cellules β . La première hypothèse repose sur la mort des cellules β par une infection virale [167]. Ainsi, il a été démontré que l'infection par certains virus tels que le coxsackie B ou le virus de la rubéole entraîne la lyse des cellules β . Les caractéristiques intrinsèques des cellules β sont aussi présentées comme un facteur associé au déclenchement de la maladie. En effet, il a été démontré que plus de 50% des gènes associés à une susceptibilité de développer le DT1 sont exprimés par ces cellules [168]. Une troisième hypothèse repose sur le mimétisme moléculaire de certains virus pour des auto-antigènes exprimés par les cellules β . Comme nous l'avons vu précédemment un certain nombre de LT auto-réactifs échappent à la tolérance centrale et se retrouvent en périphérie, c'est le cas de LT auto-réactifs vis-à-vis d'IGRP auto-antigène exprimé par les cellules β . Cependant, grâce à l'existence des mécanismes de tolérances périphériques ces LT auto-réactifs ne s'activent pas. Dans le cas d'une infection, par un virus présentant des motifs moléculaires similaires à des auto-antigènes (ex : motif peptidique similaire d'IGRP) ces LT auto-réactifs pourront être activés de façon à lutter contre le virus mais entraîneront également la destruction des cellules β . Les auto-antigènes relargués suite à la destruction de ces cellules seront captés par les DCs présentes dans le tissu (figure 14) [169]. La

présence de cytokines pro-inflammatoires liée à la destruction des îlots entraîne l'activation des DCs qui à leur tour activeront les LTCD4 auto-réactifs. Ces derniers produiront des cytokines telles que l'IFN- γ ou le TNF- α permettant l'activation des macrophages et la différenciation des LB en plasmocytes produisant des anticorps. Ces anticorps pourront se fixer aux cellules β et induire leur destruction par activation du complément. De plus, sous l'influence des cytokines pro-inflammatoires les DCs pourront cross-présenter les auto-antigènes aux LTCD8 cytotoxiques [170]. Ces derniers de par leur action cytotoxique et la libération de granzyme B et perforine détruiront les cellules β . Malgré la présence de LTreg cette boucle d'activation pro-inflammatoire conduit à la production de cytokine comme l'IL-21 qui inhibe l'activité suppressive des LTreg [169]. La destruction des îlots entraîne l'exposition de nouveaux motifs moléculaires, c'est le phénomène d'épitope spreading [171]. Ce phénomène entraîne une amplification de la réponse auto-immune conduisant à la chronicité de la maladie. L'analyse de pancréas de personnes diabétiques *post mortem* a mis en évidence la présence de LTCD8 et CD4 ainsi que des LB et macrophages dans les îlots infiltrés [172]. Au sein de ces populations, on note une fréquence importante de LTCD4 et LTCD8 spécifiques d'antigènes des cellules β du pancréas comme l'insuline ou la Glutamate déshydrogénase 65 (GAD 65) qui participent activement à la destruction des îlots [173]. De nombreuses études chez la souris mais également chez l'homme, présentent les lymphocytes T CD8+ comme jouant un rôle majeur dans la destruction des cellules β . Chez la souris NOD notamment, l'inactivation du gène codant pour la β 2 microglobuline (sous unité du CMHI) inhibe l'apparition du diabète [174]. Associées à l'activation de LTCD8 auto-réactifs certaines études ont mis en évidence chez des patients atteints de DT1 un nombre légèrement diminué LT reg ainsi qu'une efficacité réduite de ces derniers [175]. De plus l'observation que certaines cytokines telles que l'IL-21 rendent insensibles les LT effecteurs à l'action des LTreg dans des modèles de diabète pourrait expliquer l'échec de certain mécanisme de tolérance en périphérie [176]. De même, l'environnement pro-inflammatoire

associé à la destruction des îlots induit l'activation et la maturation des CPA qui dans cet état induiront l'activation des LT auto-réactifs [177].

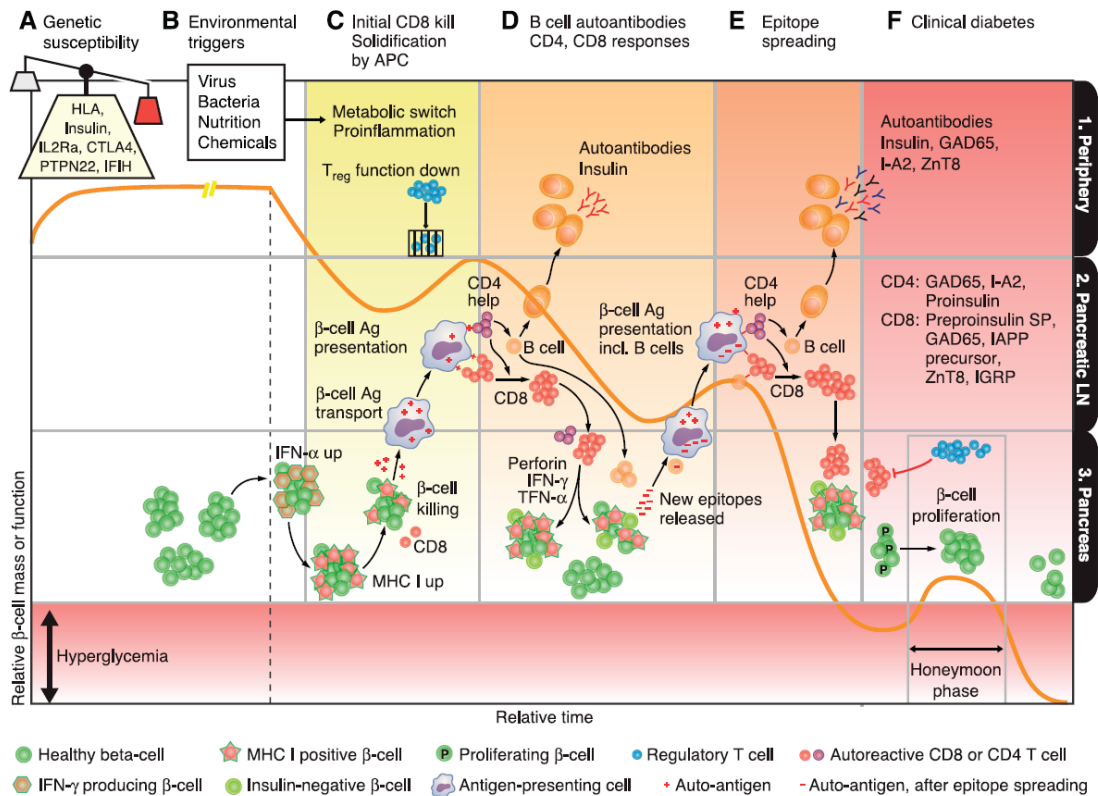


Figure 14: Evènements immunologiques conduisant au DT1. En phase A et B, l'individu n'est pas malade, mais peut présenter des facteurs de risque (ex : susceptibilité génétique). En phase C et D, le système immunitaire s'attaque aux cellules β , mais l'individu reste asymptomatique car la masse de cellules β reste suffisante pour réguler la glycémie. La phase D marque l'entrée dans la chronicité avec la reconnaissance de nouveaux épitopes (épitope spreading) libérés suite à la destruction des cellules β . En phase F, le diabète peut être diagnostiqué car la masse relative de cellules β est insuffisante pour réguler la glycémie. D'après [169]

1.4.2 La sclérose en plaques :

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire chronique du système nerveux central (SNC) qui se traduit par une neurodégénérescence liée à une démyélinisation des axones. La gaine de myéline joue le rôle d'isolant électrique permettant d'optimiser l'influx nerveux. Lorsque cette gaine est détruite l'influx nerveux est perturbé conduisant à des troubles moteurs et psychologiques. La composante auto-immune reste à ce jour discutée mais les similitudes épidémiologiques et physiopathologique avec le DT1 sont autant d'arguments en faveur de cette hypothèse [178]. A l'instar du DT1 trois hypothèses principales sont avancées pour tenter d'expliquer le déclenchement de la maladie, l'influence de l'environnement, la génétique et la dérégulation du SI [179].

1.4.2.1 Physiopathologie :

A la différence du DT1 l'organe cible de la réaction auto-immune dans le cas de la SEP présente des particularités anatomiques qui lui ont valu pendant longtemps d'être classé dans les sites immunologiquement privilégiés. En effet, la présence de la barrière hématoencéphalique, la rareté des cellules présentatrices d'antigènes, le faible niveau d'expression de CMH de classe II et l'expression de facteurs solubles anti-inflammatoires au niveau du SNC étaient autant d'arguments justifiant ce classement. Cependant, cette vision semble remise en question par différentes études montrant la présence de LTCD4 circulants dans le SNC en l'absence d'inflammation [180], ainsi qu'un système lymphatique drainant [181]. Les modèles animaux ont permis de mieux comprendre la physiopathologie de la SEP c'est le cas de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE). C'est un modèle induit par immunisation de l'animal avec un neuroantigène composant de la myéline telles que la Myéline Basic Protein (MBP) ou Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG) ou encore ProteoLipid Protein (PLP) [182]. Cette immunisation conduit au développement d'une

réponse immunitaire majoritairement médiée par les LTCD4. Ce sont les seuls acteurs immunitaires capables d'induire l'EAE dans un animal immunocompétent après transfert adoptif [183]. Ils présentent deux phénotypes distincts basés sur les cytokines qu'ils sécrètent, respectivement de l'IFN- γ pour les Th1 et de l'IL-17 pour les Th17. Le transfert adoptif de Th1 ou Th17 spécifique d'un neuroantigène dans un animal immuno-compétent induit le développement de l'EAE [184]. Le rôle respectif des Th1 et Th17 n'est pas totalement élucidé cependant les Th1 seraient impliqués dans l'initiation de l'inflammation de la moelle épinière entraînant l'activation des Th17 qui favoriserait le recrutement des cellules immunitaires dans le SNC. Le rôle distinct de ces cellules s'explique en partie par les cytokines qu'elles sécrètent [185] et l'expression à leurs surfaces de différentes molécules d'intégrines et de récepteurs aux chemokines [186]. De façon intéressante les LTCD8 sont retrouvés en faible nombre au niveau des lésions cérébrales suggérant un rôle limité de ces derniers dans le développement de l'EAE. De même, les LB ne sont pas indispensables au développement de l'EAE mais des anticorps spécifiques de MOG ont été identifiés et peuvent contribuer au processus de démyélinisation. Les cellules phagocytaires telles que les macrophages [187] et les cellules de la microglie [188] sont aussi fortement impliquées dans la dégradation de la myéline et la mort axonale.

2 Les stratégies d'induction de tolérance : De l'immunosuppression généralisée à l'immuno-modulation antigène spécifique:

L'immunosuppression dans le cadre de l'auto-immunité a pour objectif d'inhiber le système immunitaire afin de stopper l'agression des cellules auto-réactives. Les agents chimiques sont utilisés depuis près d'un demi-siècle et présentent un effet d'immunosuppression généralisée passant par cinq grands modes d'actions. De par leurs actions aspécifiques, ils affectent l'ensemble des cellules de l'organisme conduisant à de nombreuses complications allant d'infections bactériennes ou virale au développement de tumeur et de pancréatite (tableau 4) [189]. Afin de contourner ces problèmes, de nouveaux outils thérapeutiques biologiques tels la thérapie cellulaire [190] ou les anticorps monoclonaux [191](AcMo) ont été développés. Ces derniers permettent de cibler de façon spécifique les cellules immunitaires. De par leurs fonctions biologiques, ils peuvent dépléter des cellules immunitaires comme les LT et LB impliqués dans la physiopathologie de nombreuses maladies auto-immunes. Ils sont aussi capables d'inhiber l'action de facteurs solubles tels que le TNF- α ou encore de moduler les voies de co-stimulation telles que CD28 B7 [192] impliquées dans la mise en place de réponse immunitaire adaptative. Leur utilisation en clinique s'avère efficace pour lutter contre le développement des maladies auto-immunes mais l'effet immunosuppresseur généralisé de telles stratégies conduit à des effets secondaires indésirables [193] comme le développement de maladies opportunistes telles que la tuberculose ou infection par le toxoplasme. Afin d'éviter de tels effets secondaires, de nouvelles stratégies d'immunosuppression dites antigène spécifique ont vu le jour [194]. Ces stratégies consistent à inhiber spécifiquement les cellules auto-réactives afin que les autres composants du système immunitaire restent fonctionnels. Ainsi l'administration de séquence peptidique similaire à certains auto-antigènes [195], l'utilisation de la thérapie génique [196]

ou cellulaire [197] ou encore l'application des nanotechnologies [198] se révèlent être des stratégies prometteuses. Cependant, de nombreux obstacles restent à franchir.

2.1 Les stratégies d'immunosuppressions généralisées:

2.1.1 Les agents chimiques et modes d'actions :

Parmi les différents immunosuppresseurs chimiques existant 5 grands modes d'action ont été décrit. Le premier mode d'action est la modification de l'expression de gènes impliqués dans l'immunité tels que le gène de l'IL-6 ou l'IL-8 [199]. Ce mode d'action est celui des glucocorticoïdes (ex : Cortisol ou Dexaméthasone). Ces derniers se fixent aux récepteurs aux glucocorticoïdes situés dans le cytoplasme entraînant leur translocation au niveau du noyau modifiant ainsi l'expression de gènes impliqués dans l'immunité. Il a été démontré que le Dexaméthasone inhibe la sécrétion d'IL-2 et d'IFN- γ par des lymphocytes activés avec de la concanavalin A [200].

Le deuxième mode d'action concerne les agents alkylants [201] tels que la cyclophosphamide qui, entraînent l'ajout de groupements alkyle au niveau de l'ADN. Ces groupements, inhibent la réplication cellulaire, empêchant de fait le développement d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire.

Les inhibiteurs de kinases et phosphatases représentent le troisième mode d'action des immunosuppresseurs chimiques [202]. C'est le cas d'agents tels que de la cyclosporine A ou encore le FK-506. Lors de leur utilisation, ils inhibent des voies de signalisation telles que JNK ou encore p38 MAPK associées aux récepteurs des LT, inhibant ainsi leur activation.

Les quatrième et cinquième modes d'action des immunosuppresseurs chimiques sont respectivement les inhibiteurs du métabolisme de la synthèse purique tels que le mycophenolate mofetil, [202] et pyrimidique, tels que le leflunomide. Ces derniers, en empêchant la synthèse de base purique ou pyrimidique, empêchent la formation de l'ADN indispensable à la réplication cellulaire. Malgré leur efficacité l'utilisation de ces agents chimiques impacte l'ensemble des cellules de l'organisme, générant de nombreux effets secondaires indésirables tels que le développement de tumeurs secondaires ou encore de l'ostéonécrose [189].(cf tableau 4).

Mécanismes d'actions	Médicaments	Cible(s)	Effets secondaires
Régulateur de l'expression génique	Glucocorticoïdes	Récepteurs aux glucocorticoïdes	-Infections bactériennes ou virales -Ulcère -Ostéonécrose
Agents alkylants	Cyclophosphamide	ADN	-Neutropénie -Tumeurs secondaires
Inhibiteurs de kinase et phosphatase	Cyclosporine A	JNK/P38 kinase et calcineurine	-Néphrotoxicité - Hypertension artérielle
	Tacrolimus	JNK/P38 kinase et calcineurine	(idem)
	Rapamycine	Cycline	
Inhibiteur de la synthèse de base purique	Azathioprine		-Leucopénie -Tumeurs malignes -Pancréatite
	Mycophenolate mofetil	IMPDH	(idem)
Inhibiteur de la synthèse de base pyrimidique	Leflunomide	DHOD	

Tableau 4: Les différents modes d'actions des immunosuppresseurs chimiques.

2.1.2 Les anticorps monoclonaux (AcMo) :

Afin de cibler plus spécifiquement les cellules immunitaires, des outils thérapeutiques basés sur la spécificité de reconnaissance des anticorps ont vu le jour. C'est en 1975 que Kohler et Milnstein décrivent pour la première fois la technique permettant de générer *in vitro* des AcMo [203]. Des anticorps sont qualifiés de monoclonaux lorsqu'ils reconnaissent la même séquence peptidique d'un même antigène (épitope) et sont générés par une même lignée de plasmocytes. Les premières utilisations chez l'homme d'anticorps monoclonaux générés chez la souris ont mis en évidence une forte réaction immunitaire dirigée contre ces anticorps [204]. Ces observations ont conduit au développement d'anticorps moins immunogènes [205] tels que :

- les anticorps chimériques possédant un fragment Fc humain et une région variable de souris.
- les anticorps humanisés avec la partie hypervariable uniquement de souris
- les anticorps monoclonaux totalement humanisés.

L'activité biologique des AcMo passe dans un premier temps par la reconnaissance de l'antigène via son fragment de reconnaissance de l'antigène appelé (Fab). Par cette fixation, l'AcMo peut avoir un rôle activateur lorsqu'il se fixe à un récepteur ou, à l'opposé, un rôle d'antagoniste empêchant la fixation d'une molécule à sa cible. Dans un deuxième temps, la fraction Fc de l'anticorps peut induire la destruction de la cible par activation du complément ou du processus de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). De par leurs propriétés d'activation, d'inhibition ou encore de déplétion, les anticorps représentent un outil thérapeutique d'intérêt pour moduler la réponse immunitaire adaptative en ciblant les lymphocytes acteurs majeurs des réponses auto-immunes [191]. Actuellement, de nombreuses recherches portent sur l'optimisation des effets de ces anticorps en utilisant non

plus l'anticorps dans son ensemble mais seulement des fragments (figure15). Ainsi, des anticorps appelés ScFv [206] correspondant uniquement au domaine variable de la chaîne lourde et légère associée entre elles par un « flexible linker » sont à l'heure actuelle en développement. Ces derniers présentent une affinité et une facilité d'accès augmentées grâce à leur petite taille.

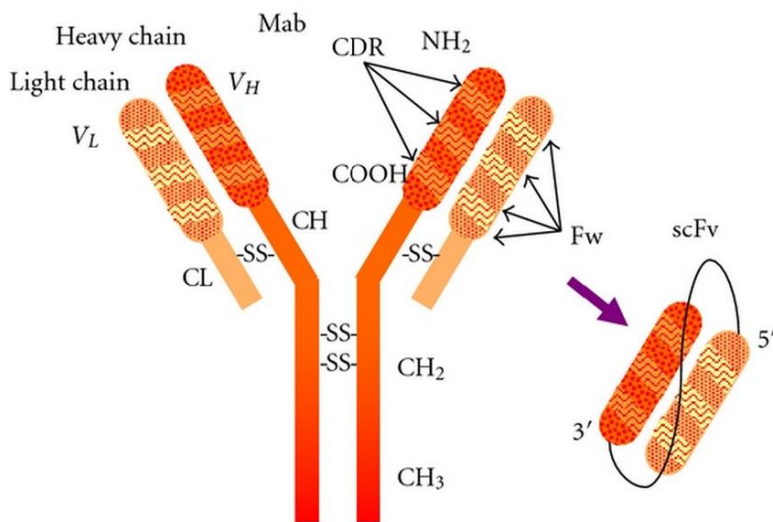


Figure 15: Représentation schématique d'un anticorps et d'un ScFv. En orange foncé les deux chaînes lourdes reliées entre elles par deux ponts disulfures, en orange claire les deux chaînes légères. D'après [206]

2.1.2.1 Modulation de la réponse immunitaire par les anticorps monoclonaux:

La modulation de la réponse immunitaire par les AcMo passe par cinq mécanismes d'action (figure 16) [191] :

- Le coating, inhibant l'interaction cellule-cellule ou la fixation de ligand,
- la déplétion par activation du complément ou l'ADCC ou l'induction d'AICD,
- L'inhibition de l'expression de récepteur à la surface des LT,

-L'induction de voies de signalisation induisant l'anergie ou la délétion clonale des LT auto-réactifs ou l'induction de LTreg,

-La fixation de ligand empêchant la fixation au récepteur.

Le premier anticorps monoclonal utilisé en clinique fut un anti-CD3 (OKT3) dans le cadre d'une allogreffe rénale [207]. Depuis sa première utilisation en clinique l'anti-CD3 a été humanisé (OKT3γ1 Ala-Ala) de façon à diminuer son immunogénicité. L'efficacité thérapeutique de cet anticorps a été évaluée dans le cadre du diabète de type 1 dans un essai clinique de phase I et II [208]. Il a été démontré que l'administration de cet anticorps chez des patients diagnostiqués diabétiques depuis 6 semaines permet le maintien ou l'amélioration de la glycémie pour 9 des 12 patients, quand seulement 2 patients sur 12 ont présenté une glycémie stable pour le groupe contrôle. L'effet bénéfique de l'anti-CD3 ne semble pas être associé à une déplétion des lymphocytes T mais plus à l'induction de cellules régulatrices ou d'anergie des LT auto-réactifs. En effet, les patients ayant reçu l'anticorps présentent un taux d'IL-10 plus important et une proportion LTCD4 et LTCD8 modifiée. De par le rôle prépondérant des LB dans certaines maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde ou l'anémie hémolytique, des anticorps monoclonaux visant à dépléter les LB ont été utilisés en clinique [209]. Il a ainsi été démontré que l'administration d'un anticorps dirigé contre le CD20 (rituximab) permet de diminuer de façon significative les symptômes de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, liée à une déplétion des LB. Le ciblage des molécules impliquées dans le recrutement des lymphocytes au niveau du site de l'inflammation s'avère une stratégie efficace dans le traitement de certaines maladies auto-immunes [210]. C'est le cas du Natalizumab qui se fixe à VLA-4 et empêche l'interaction avec VCAM-1, indispensable au processus de sortie des cellules immunitaires de la circulation sanguine (diapédèse) [211]. Il a ainsi été démontré que l'administration de cet anticorps inhibe le développement de l'EAE et est associée à une diminution de la progression de la SEP chez l'homme. Parmi les différentes stratégies d'immuno-régulation

par les AcMo visant les lymphocytes, l'inhibition de la différenciation des LTCD4 en Th1 ou Th17 s'avère efficace dans la lutte contre la polyarthrite rhumatoïde (PR) [212]. Ainsi, le tocilizumab se fixant au récepteur de l'IL-6, inhibe la différenciation de LTCD4 en Th17. Il a ainsi été démontré que l'injection de tocilizumab a des effets bénéfiques chez des patients atteints de PR. Enfin, le ciblage des voies de co-stimulation telles que CD28/B7 s'avère bénéfique dans l'induction d'une tolérance dans un modèle de greffe allogénique rénale chez le rat en diminuant le rejet aigu et chronique. Cette tolérance est associée à une inhibition de la prolifération des PBMC du receveurs vis-à-vis des cellules du donneur [213]. L'ensemble de ces études met en évidence l'efficacité thérapeutique des AcMo dans le traitement des maladies auto-immunes [214]. Cependant ces stratégies se heurtent à certains problèmes...

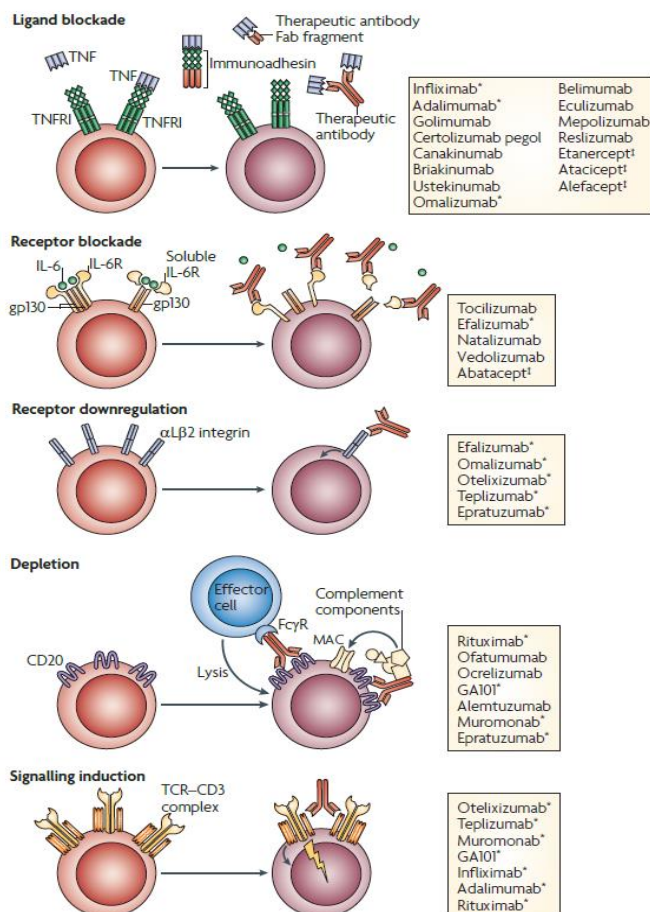


Figure 16: Mode d'action de la modulation de la réponse immunitaire par les anticorps monoclonaux. D'après [191]

2.1.2.2 Limite à l'utilisation des anticorps monoclonaux :

L'utilisation des anticorps monoclonaux est associée à des effets indésirables aigus et chroniques [193]. En effet, l'administration d'AcMo chez un individu est rapidement associée (env 30 minutes post injection) à un phénomène appelé « orage cytokinique » qui se traduit par une sécrétion massive de cytokine telles que l'IL-2, l'IL-6 ou encore l'IFN- γ conduisant à une forte fièvre et à des nausées. Il a ainsi été reporté par Herold et al [208], dans l'évaluation clinique de l'anti-CD3 dans le cadre du DT1, que certains patients traités présentaient de la fièvre, des éruptions cutanées et des nausées. Ce phénomène est principalement observé lors de l'utilisation d'AcMo déplétants (ex : rituximab). Les effets chroniques de l'utilisation des AcMo sont liés à leur activité immunosuppressive qui conduit, dans certain cas, à des infections opportunistes telles que la tuberculose ou infection par le toxoplasme. Il a ainsi été rapporté dans le cas de l'utilisation du tocilizumab comme traitement de la PR que 11 patients ont développé des infections sévères [212].

2.2 L'induction de tolérance antigène spécifique :

Afin de contourner les effets secondaires indésirables associés à l'utilisation d'AcMo, un des objectifs actuels des recherches en induction de tolérance immunitaire est le développement de traitements inhibant spécifiquement les cellules immunitaires auto-réactives. L'intérêt d'une telle thérapie est l'inhibition de l'auto-réactivité tout en gardant le système immunitaire fonctionnel et réactif.

2.2.1 L'administration de peptide soluble :

L'administration d'une grande quantité de peptide soluble correspondant à un auto-antigène reconnu par les LT auto-réactifs, est une des premières stratégies d'immunosuppression antigène spécifique à avoir été évaluée. Il a ainsi été démontré que l'administration de fortes doses de MBP dans un modèle d'EAE chez la souris diminue de façon significative la sévérité de la maladie [215]. De façon intéressante, la voie d'administration de la MBP en intrapéritonéale (IP) ou en intraveineuse (IV) se traduit respectivement par une anergie [195] et une délétion des LT auto-réactifs [216]. De même chez la souris NOD il a été démontré que l'administration intranasale ou sous cutanée d'un peptide de l'insuline B-(9-23) retarde de façon significative l'apparition et l'incidence du diabète [217]. Cependant certaines études ont montré que l'administration en IV de peptide tel que le MBP est associée à des chocs anaphylactiques létaux chez différentes souches de souris. De plus, l'administration en IV du peptide MOG dans un modèle d'EAE chez le primate est associée à une exacerbation de la maladie [218].

Ces résultats mettent en avant l'importance de la voie d'administration du peptide dans le développement de la tolérance. Ainsi, certaines équipes ont émis l'hypothèse que l'administration de peptide au niveau des muqueuses (orale et nasale) permettrait de reproduire le phénomène de tolérance naturellement observé pour les antigènes alimentaires. Ainsi, l'étude de Bitar et al [215] est la première à mettre en évidence que l'administration de MBP par voie orale chez le rat induit un retard significatif du développement de l'EAE ainsi qu'une diminution de la sévérité de la maladie. Il a été démontré que les effets bénéfiques de l'administration par voie orale de quantités importantes d'antigènes dans des modèles auto-immuns est associée à une anergie ou délétion des lymphocytes T auto-réactifs. De façon intéressante, l'administration de faibles doses d'antigènes est aussi associée à des effets bénéfiques mais principalement dus à

l'induction de LTreg.[219]. Cependant, les essais cliniques chez l'homme de l'administration de peptide par voie orale dans le traitement de la SEP et du DT1 se sont montrés inefficaces [220]. Afin d'optimiser l'efficacité de tolérance, de nouveaux peptides ont été générés. Ces peptides possèdent une séquence d'acides aminés très proches de ceux des auto-antigènes reconnus par les LT auto-réactifs mais différent d'un ou de plusieurs acides aminés et sont qualifiés de peptide altéré. C'est le cas du glatiramère acétate un polymère de quatre acides aminés présent dans la MBP. Il a été démontré que l'administration précoce de ce polymère chez des patients SEP est associée à un retard significatif de l'apparition de lésions cérébrales détectées par IRM [221]. Il est important de noter que l'évaluation clinique d'autres peptides altérés dérivées de la MBP (ex :MPB 83-99) ont révélé des problèmes de toxicité et d'exacerbation de la maladie conduisant parfois à l'arrêt des essais cliniques [222].

L'enzyme Glutamic acid decarboxylase (GAD) catalyse la formation du neurotransmetteur « γ -aminobutyric acid » encore appelé GABA et est fortement exprimée au niveau du système nerveux central et par les cellules β du pancréas [223]. Il a été mis en évidence que l'isofome GAD65 présente des propriétés immunogéniques importantes dans le cadre du DT1 [223]. Ainsi, de par le rôle majeur de cet antigène dans le développement du DT1 des stratégies d'immunosuppression spécifiques de cette antigène ont été développées [224][225]. Il a ainsi été mis en évidence que l'administration intranasale de peptide dérivé de GAD65 permet d'inhiber le développement du diabète chez la souris NOD. Cette protection est associée à un switch de phénotype des LTauto-réactifs vis-à-vis de GAD65 passant d'un profil Th1 à un profil Th2 [226]. Cependant, au regard des échecs rencontrés par l'administration de peptides seuls chez l'homme, une nouvelle formulation a été développée [227]. Il a été associé à GAD 65 un adjuvant, l'hydroxide d'aluminium (Alum) rentrant dans la composition de certains vaccins permettant de lutter contre l'hépatite B ou encore l'Anthrax. Cet adjuvant a été sélectionné de par sa capacité à induire une réponse de type Th2 protectrice dans le DT1. Cependant, les applications à la clinique se sont montrées peu concluantes [228]. En effet, dans un premier essai clinique de phase I chez des patients

diagnostiqués diabétiques depuis moins d'un mois, il a été mis en évidence que l'administration sous cutanée de GAD65-Alum ne permet pas de stopper la diminution de production d'insuline mais est associée à un maintien du niveau de sécrétion de C-peptide (précurseur de l'insuline) à un niveau constant jusqu'à 30 mois après le traitement [228]. Cependant, un essai clinique de phase II de la même équipe met en évidence que la concentration du C-peptide décline également [229].

Une stratégie alternative à l'administration d'un peptide seul est sa fusion avec un anticorps dirigé contre un récepteur exprimé par les DC tels que DEC-205 ou ASGPR. L'étude de Li et al [230] démontre que l'administration d'un antigène du soi ou du non soi, lorsqu'il est fusionné avec un anti-ASGPR exprimé par les DCs humaines, est associée à une inhibition antigène spécifique des LTCD4. Il démontre que cette inhibition est dépendante de la sécrétion de l'IL-10 par les DC ASGPR+. L'administration de peptide soluble représente une stratégie d'induction de tolérance antigène spécifique intéressante. Cependant, les problèmes d'efficacité et parfois même de toxicité chez l'homme nécessitent une meilleure compréhension du mécanisme d'action, et l'évaluation de nouveaux protocoles d'administration.

2.2.2 Thérapie génique :

La thérapie génique permet par définition l'incorporation de gène(s) dans des cellules d'un organisme pour y corriger une anomalie. Dans le cas de l'auto-immunité, les stratégies de thérapies géniques consistent à restaurer la tolérance vis-à-vis d'un auto-antigène donné [196]. Pour cela, deux stratégies peuvent être utilisées. La première de ces stratégies repose sur l'induction de l'expression d'un auto-antigène dans des organes « pro-tolérologènes » tels que le foie ou encore le thymus. Il a ainsi été démontré que l'expression ectopique de la MBP au niveau du foie par l'injection d'un adeno associated virus (AAV) est associée à une

inhibition du développement de l'EAE. Cette tolérance est liée à l'induction de iLT CD4+CD25+FoxP3+ spécifiques de la MBP capables d'inhiber l'EAE après un transfert adoptif [231]. De plus, l'étude de Marodon et al [232] a démontré que l'administration d'un lentivirus codant pour l'hémagglutinine (HA) en intra thymique chez la souris est associée à une sélection négative des LT anti (HA) et à une augmentation du nombre de LTreg spécifiques de l'HA. Il est démontré que cette injection intra thymique protège d'un diabète induit dans des souris transgéniques exprimant l'HA au niveau du pancréas et ayant reçu un transfert adoptif de LT anti HA. De plus, il est démontré que l'injection d'un lentivirus codant pour la préproinsuline-2 inhibe le développement du diabète chez des souris NOD. La deuxième stratégie d'induction de tolérance antigène spécifique par thérapie génique repose sur la modification de certains sous types cellulaires tels que les cellules souches hématopoïétiques ou les lymphocytes B. L'étude de Xu et al [233] a ainsi démontré que l'administration de cellules souches hématopoïétiques transduites avec un rétrovirus codant pour la protéolipid protein (PLP) permet d'inhiber l'EAE chez la souris. Cette inhibition est associée à une diminution de la prolifération des LT spécifiques du peptide PLP p139-151. La même équipe démontre que la transduction de LB avec un rétrovirus codant pour une IgG et antigen (ici MBP et GAD) permet d'inhiber respectivement le développement de l'EAE et du diabète. Il démontre que la protection observée est bien antigène spécifique car l'administration du rétrovirus IgG-MBP ne permet pas d'inhiber une EAE induite par immunisation avec PLP [234]. Cependant, bien que la biosécurité des thérapies géniques ce soit fortement améliorée ces dernières années, les outils de diagnostic permettant d'évaluer les risques associés à une utilisation clinique restent limités. [235]

2.2.3 Thérapie cellulaire :

2.2.3.1 Lymphocyte T reg :

De par leur rôle clé dans le maintien de la tolérance périphérique, les LTreg représentent une cible d'intérêt dans le développement de stratégie d'induction de tolérance antigène spécifique. Il a ainsi été démontré que l'administration préventive de iLTreg induits par traitement au TGF β et spécifiques d'un auto-antigène exprimé au niveau des cellules β , inhibe le développement du DT1 [236]. Ces iLTreg inhibent le priming et la prolifération des LT auto-réactifs en inhibant l'expression des molécules de co-stimulation à la surface des DC. L'effet bénéfique des iLTreg a également été démontré en curatif où ils sont associés à une diminution de la sévérité de l'EAE [237]. L'injection de ces iLTreg est associée à une anergie *in vivo* des LT auto-réactifs, dépendante de la sécrétion d'IL-10. Cependant, bien que les LTreg possèdent des propriétés immunosuppressives particulièrement efficaces, leur utilisation en thérapie se heurte à plusieurs difficultés : l'absence de marqueur spécifique des LTreg permettant de les trier de façon précise, une activité immunosuppressive qui n'est pas toujours spécifique de l'antigène pour lequel ils sont spécifiques pouvant aggraver la pathologie, l'absence de stabilité des iLTreg pouvant, sous certaines conditions (inflammation), perdre leur propriété tolérogène, et enfin, la difficulté à les amplifier *in vitro* avant de les réinjecter chez le patient. Ces éléments représentent autant d'obstacles à leur utilisation en clinique. [190].

2.2.3.2 Cellules présentatrices d'antigène :

De par leur capacité à moduler de façon antigène spécifique la réponse T les CPA sont des cibles d'intérêt dans le développement de nouvelles stratégies d'immunosuppressions. Ainsi, le chargement de CPA avec un auto-antigène et leur fixation à l'éthylène carbodiimide puis leur réinjection représente une stratégie d'induction de tolérance antigène spécifique efficace. En effet, l'étude de Miller et al [239] est la première à décrire ce

protocole et à mettre en évidence que la réinjection de splénocytes chargés avec du DNFB et fixés présente un potentiel tolérogène. Quelques années plus tard il est mis en évidence que l'administration de splénocytes chargés avec une mixture d'antigènes dérivées de la myéline inhibe le développement de l'EAE [240]. De même, chez la souris NOD il a été démontré que l'administration de CPA couplé à l'insuline permet de reverser le DT1 [241]. Cette tolérance est associée à une anergie des LT pathogéniques ayant une prolifération fortement diminuée et une sécrétion d'IFN- γ et d'IL-2 inhibée. De façon intéressante, il est démontré que cette tolérance est dépendante de la voie de signalisation PD-1 PDL-1 car elle est inhibée par l'ajout d'anti PD-1 ou anti-PDL-1.

A la différence de l'injection de peptides seuls qui sont parfois associés au développement de choc anaphylactique cette méthode semble être bien tolérée par l'organisme. En effet, Il a été rapporté dans un essai clinique de phase I que l'administration autologue de cellules mononucléaires chargées avec sept peptides dérivés de la myéline est bien tolérée par les patients SEP et ne présente pas de toxicité. Les LT isolés de patient ayant reçu le plus de cellules sont ceux présentant un niveau réactivation *in vitro* plus faible en réponse aux différents peptides [242].

Le mécanisme par lequel ces CPA couplés avec un antigène induisent une tolérance n'est pas totalement élucidé. Il était initialement pensé que la présentation de l'antigène par des CPA n'exprimant pas les molécules de co-stimulation nécessaires entraînait une anergie des LT spécifiques de l'antigène présenté [243]. Or, il a été mis en évidence que rapidement après leur injection les CPA couplés avec un antigène meurent par apoptose. Il a été démontré que ces corps apoptotiques sont ensuite internalisés par des CPA principalement les macrophages de la zone marginale de la rate par l'intermédiaire de récepteurs scavenger tels que CD68 ou SRB [244]. Les macrophages sécrètent des médiateurs solubles tels que l'IL-10 ou le TGF- β et peuvent par échanges de membranes transférer l'antigène aux DC. Ces dernières, en sur-exprimant des molécules de co-stimulations inhibitrices (ex : PDL-1)

ou en sous-exprimant des molécules activatrices comme CD86 ou encore en induisant des LTreg peuvent inhiber les LT de manière antigène spécifique (Figure 17). Malgré l'efficacité de ce protocole l'isolation de cellules syngéniques et leurs fixations puis réinjections représentent un frein à une application clinique c'est pourquoi, une nouvelle stratégie émerge visant à remplacer les cellules par des nanoparticules.

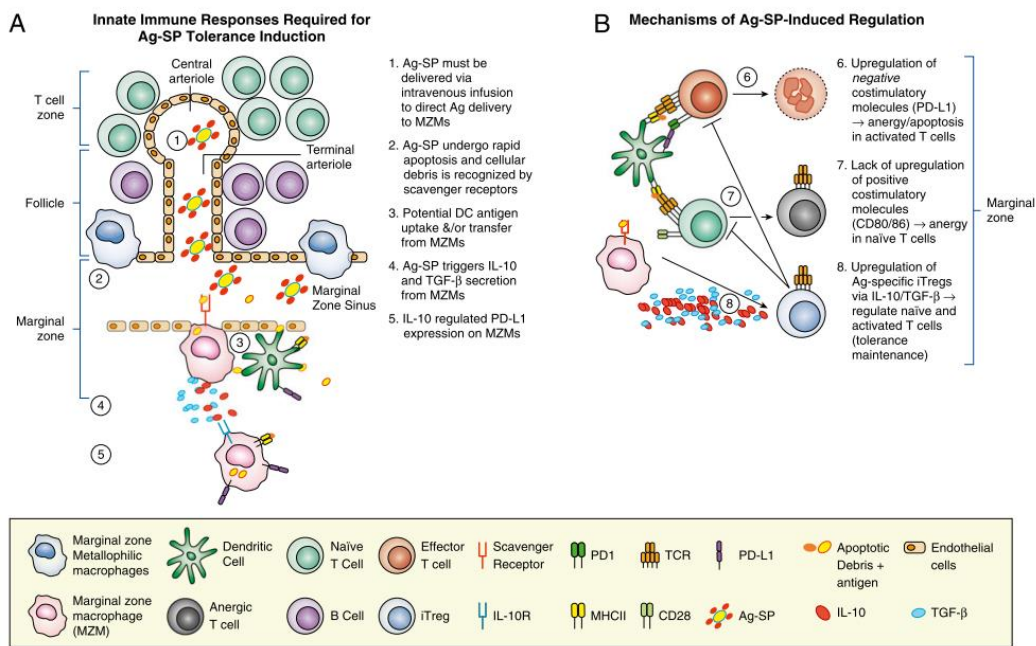


Figure 17 : Induction de tolérance antigène spécifique par l'administration de CPA chargé avec un autoantigène. La partie gauche du schéma représente l'internalisation des corps apoptotiques par les macrophages de la rate. La partie droite détaille les mécanismes de tolérisation des LT auto-réactifs par les CPA. D'après [243]

2.2.4 Utilisation des nanoparticules :

Cette technique d'induction de tolérance antigène spécifique se base sur l'administration intraveineuse d'un antigène contenu dans une nanoparticule inerte. L'équipe de Stephen D Miller est la [245] première à mettre en évidence l'efficacité de cette stratégie dans l'inhibition de l'EAE. Il a ainsi été démontré que l'administration de PLP139-151 associée à une nanoparticule de (lactide-co-glycolide) de 500nm permet l'inhibition de l'EAE de manière antigène spécifique. Il démontre que cette protection est dépendante de l'expression du récepteur scavenger MARCO principalement exprimé par les macrophages de la zone marginale de la rate suggérant un rôle de ces derniers dans la protection observée. L'injection du complexe nanoparticule/antigène est associé à une diminution du nombre de LT antigène spécifique dans le sang périphérique alors que le nombre de LT antigène spécifique augmente légèrement dans les organes lymphoïdes secondaires. Il démontre que la protection est dépendante en partie de l'activité des LTreg mais aussi de l'anergie des LT spécifiques de l'antigène. De façon intéressante, il démontre que des nanoparticules de plus petites tailles (100nm, 4.5 et 1.75nm) s'avèrent moins voire inefficaces pour induire une tolérance. Une étude récente a montré que l'association dans ces nanoparticules d'un antigène et d'un immunosuppresseur (la rapamycine) injecté par voie intraveineuse permet d'induire une tolérance antigène spécifique même dans un contexte pro-inflammatoire [198]. Il a ainsi été démontré que des nanoparticules contenant le peptide OVA323-339 avec de la rapamycine permet de réduire la prolifération des LTCD4 spécifiques du peptide et ce de façon plus importante que la nanoparticule avec le peptide seul. De plus, ce traitement permet d'inhiber la production d'anticorps anti-OVA dans un modèle de DTH chez la souris. Malgré ces résultats prometteurs certains obstacles restent à franchir tels que l'influence de telles particules sur la santé à court, moyen et long terme. L'ensemble de ces études met en évidence l'importance des CPA dans le développement de stratégies de tolérance antigène spécifique. Une alternative attractive aux solutions déjà

existantes serait de délivrer un auto-antigène aux CPA de façon localisée (ex : par voie intradermique) dans un environnement pro-toléroène. Cet environnement, serait induit par l'administration d'agents induisant des CPA toléroènes tels que l'IL-10, le TGF- β ou encore comme nous le verrons dans la prochaine partie des inducteurs de l'HO-1. Ce principe pourrait s'apparenter à une stratégie de vaccination inversée permettant de promouvoir la tolérance vis-à-vis d'un auto-antigène en particulier.

3 L'hème-oxygénase-1, de la dégradation de l'hème à la cible thérapeutique :

C'est en 1968 que l'équipe de Schmid met en évidence l'existence d'une conversion enzymatique de l'hème en bilirubine [246]. Ils démontrent que cette conversion nécessite de l'oxygène ainsi que du NADPH et qu'elle se trouve inhibée en présence de monoxyde de carbone(CO). Un an plus tard, il démontre que cette réaction enzymatique est réalisée par l'hème oxygénase (HO). A ce jour, trois isoformes de l'HO ont été identifiées : L'HO-3, l'HO-2 et l'HO-1 [247]. L'HO-3 est une isoforme identifiée chez le rat et ayant une activité catalytique très réduite dont le fonctionnement reste mal connu [248]. L'HO-2 quant à elle, est douée d'activité catalytique et joue un rôle dans la protection neuronale contre le stress oxydatif sans présenter de caractère inductible [249]. L'HO-1 est la mieux caractérisée des trois isoformes et présente un caractère hautement inductible [250]. Tout comme, l'HO-2, elle catalyse la réaction de dégradation de l'hème en trois produits que sont le CO, les ions ferreux et la biliverdine rapidement convertie en bilirubine par la biliverdine réductase(figure 18) [251]. Le CO a démontré des propriétés hautement protectrices dans différents modèles de rongeur en mimant les effets de l'HO-1 [252].A l'état basal l'HO-1 est exprimée de façon préférentielle dans les macrophages des tissus tels que la rate ou la moelle osseuse sièges de la dégradation d'érythrocytes [253]. Ces derniers sont fortement chargés en hémoglobine protéine impliquée dans le transport de l'oxygène et composée d'hème et de globine [254]. Ainsi, les érythrocytes en fin de vie sont phagocytés par les macrophages où l'induction de l'HO-1 permet la dégradation de l'hème. Un excès d'hème dans l'organisme s'avère toxique pouvant causer des dommages vasculaires importants [255], c'est pourquoi, un système protecteur existe évitant la présence d'hème libre ou d'hémoglobine libre dans le sérum. Ainsi, l'hème libre sera captée par l'hémopexine(Hpx) [256] et l'hémoglobine (Hb) libre sera captée par l'haptoglobine (Hp) [257]. Les macrophages exprimant le CD163 récepteur au complexe Hb-Hp pourront internaliser ce complexe et métaboliser l'hème [253]. Tout d'abord

identifiée au niveau de structures subcellulaires appelées microsomes, de récentes études ont mis en évidence la présence de l'HO-1 dans différents organelles tels que les mitochondries ou encore le noyau [258]. Sa nature hautement inductible nécessite une régulation transcriptionnelle fine assurée par des facteurs de transcription activateur tel que Nrf-2 ou répresseur tel que Bach1 [259]. L'HO-1, confère des propriétés cytoprotectrices [260] aux cellules qui l'expriment en luttant contre le stress oxydatif [261] et l'apoptose [262]. L'intérêt grandissant pour l'HO-1 et ses produits de dégradation provient de sa capacité à réprimer la réponse immunitaire [263]. En effet, il a été démontré que l'induction de l'HO-1 est impliquée dans la résolution du processus inflammatoire [263]. Du fait de ses propriétés, anti inflammatoires et immuno modulatrices, l'HO-1 apparait comme un candidat de choix pour le traitement de pathologies auto-immunes.

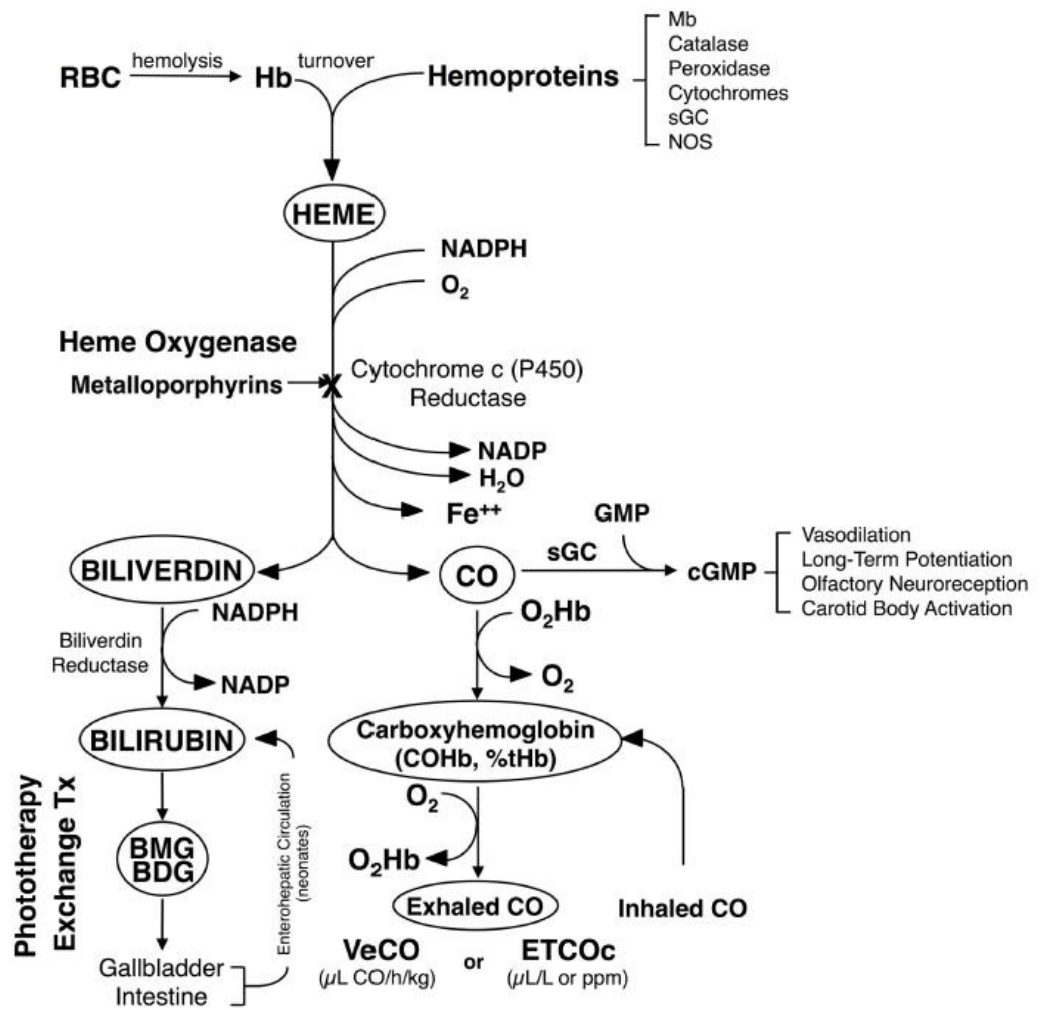


Figure 18: L'HO-1 dégrade l'hème en trois produits de dégradation. Ces trois produits de dégradation sont le monoxyde de carbon (CO), la biliverdine convertie en bilirubine et les ions Fe⁺⁺. D'après [251]

3.1 L'Hème-oxygénase-1 :

3.1.1 Localisation tissulaire :

Comme expliqué précédemment, à l'état basal, l'HO-1 est exprimée principalement dans des tissus où siège la dégradation d'érythrocytes tels que la rate, les cellules endothéliales réticulées du foie [264]. L'HO-1 est aussi détectée au niveau des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse où elle inhibe la différenciation cellulaire en abaissant la concentration intracellulaire d'hème, facteur de différenciation pour les cellules souches hématopoïétiques [265]. L'HO-1 peut aussi être détectée au niveau du parenchyme hépatique site de capture et de dégradation de l'hème plasmatique et de l'hémoglobine [266]. Dans la majorité des tissus qui ne sont pas impliqués dans la dégradation des érythrocytes ou dans le métabolisme de l'hème, le niveau d'expression de l'HO-1 à l'état basal est faible voire nul. Cependant, suite à l'exposition de stimuli chimiques (CoPP « Cobalt (III) Protoporphyrin IX chloride », Curcumin...), physique (UV) ou encore via des signaux de dangers (cytokines, infection) [267] l'ensemble de ces tissus peuvent exprimer l'HO-1. Ainsi, une grande variété de types cellulaires tels que les cellules endothéliales, les macrophages [268] ou encore les cellules dendritiques [269] peuvent exprimer l'HO-1 suite à ces signaux.

3.1.2 Localisation subcellulaire :

Au niveau cellulaire l'HO-1 a tout d'abord été identifiée au niveau du réticulum endoplasmique (RE) [246] auquel elle est rattachée par un seul segment transmembranaire hydrophobique. C'est à ce niveau qu'elle exerce son activité enzymatique de dégradation de l'hème optimisée par la co-localisation avec le cytochrome P450 réductase (CPR). Plus

récemment, il a été mis en évidence que l'HO-1 pouvait se transloquer jusqu'à la membrane mitochondriale de façon à réguler le métabolisme de l'hème dans cette organelle [270]. L'HO-1 a aussi été identifiée pour la première fois au niveau de structures associées à la membrane appelées cavéoles où son activité enzymatique est inhibée par CAV-1 [271]. Enfin, l'HO-1 a aussi été détectée au niveau du noyau de différents types cellulaires tels que des adipocytes, astrocytes ou encore DC [272]. De façon intéressante, l'HO-1 détectée au niveau du noyau présente une forme tronquée et n'est pas associée au CPR suggérant une activité non enzymatique mais plutôt transcriptionnelle [273].

3.1.3 Structure du gène de l'HO-1 :

L'HO-1 est codée par le gène *hmx-1*, chez l'homme il se localise sur le chromosome 22q12 et est composé de 5 exons d'une longueur totale d'environ 14kb (figure 19) [274]. Un fort polymorphisme du promoteur a été mis en évidence. L'existence de deux single nucleotide polymorphisms (SNP) a ainsi pu être identifiée [275]. Le premier T(-413)A qui influence l'activité du promoteur, ainsi l'allèle A confère une production plus importante de l'HO-1 *in vitro* que l'allèle T et le deuxième G(-1135)A pour lequel aucune fonction n'a encore été trouvée [276]. Associé à ces deux SNPs il a été mis en évidence en région 5' du promoteur un motif répété de deux nucléotides GT. Ce motif présente une variabilité interindividuelle avec des individus pouvant être classés en trois catégories : faible nombre de répétition (inférieur à 25), nombre moyen (25 à 29) et enfin nombre élevé (supérieur à 30) [277][278][279]. De nombreuses études ont montré qu'un nombre de répétition nGT faible (inférieur à 25) est associé à un niveau d'induction de l'HO-1 plus important qu'un nombre de motifs élevé (supérieur à 30). [275]. Ce polymorphisme a conduit à des études de corrélations montrant qu'un faible nombre de répétition de GT est associé à une probabilité réduite de développer un emphysème pulmonaire chronique chez des fumeurs [275] ou encore des lésions tissulaires post transplantation rénale [280]. Cependant, un nombre de

répétition GT faible n'est pas toujours associé à un bon pronostic c'est le cas dans le cadre du cancer du pancréas ou le mélanome [281]. L'ADN complémentaire du gène de l'HO-1 a été cloné et séquencé chez l'homme, la souris et le rat [282]. De nombreuses régions régulatrices situées en 5' du promoteur ont pu être mises en évidence (figure 19). A titre d'exemple, la séquence Antioxydant Response Element (ARE) ou encore Stress Responsive Element (StRE) permettant la fixation de facteurs de transcription tels le facteurs Nrf2, ou Bach-1 impliqués dans la régulation de l'expression d'hmox-1 [282].

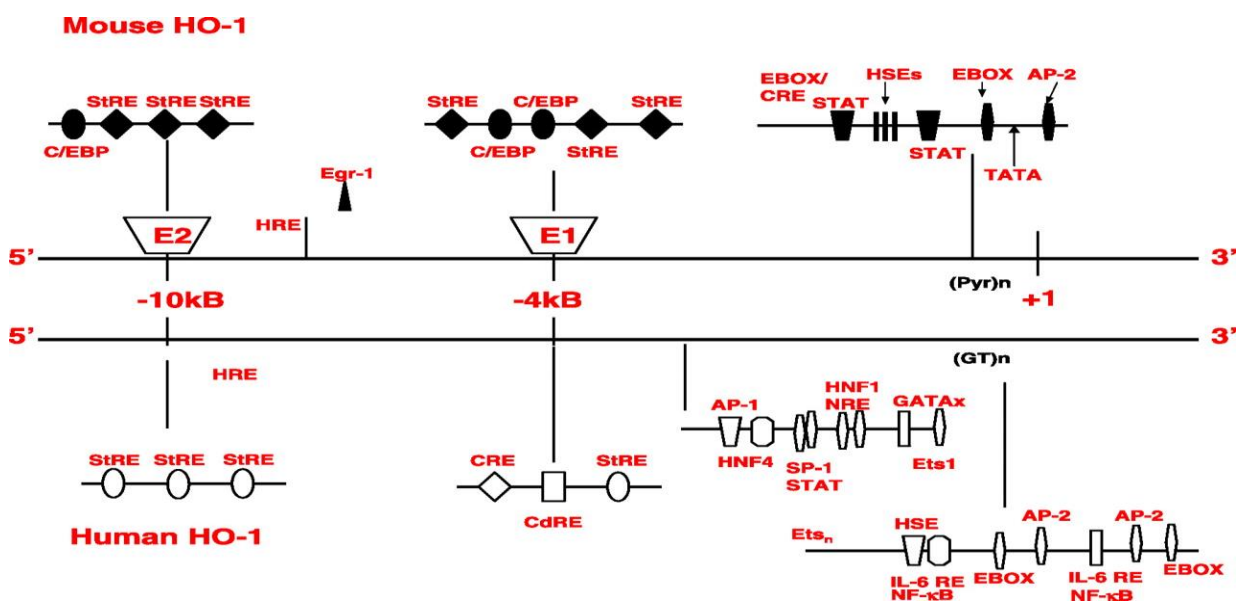


Figure 19: Comparatif de la structure d'hmox-1 chez la souris et l'homme. Sur la partie haute du schéma, une représentation du gène hmox-1 chez la souris avec deux zones de régulation importante, E2 et E1. En partie basse, le gène hmox-1 chez l'Homme avec la région du motif GT répétée. D'après [283]

3.1.4 Les facteurs de transcription et voies de signalisation impliqués dans la régulation d'hmox-1 :

Le nombre exact de facteurs de transcription intervenant dans la régulation d'hmox-1 reste à ce jour inconnu.[284]. Cependant, les deux facteurs de transcriptions principaux intervenant dans la régulation d'hmox-1 sont Nrf2 facteur de transcription activateur et Bach-1 facteur de transcription répresseur (figure 20). Le facteur de transcription Nrf2 appartient à la famille des cap 'n' collar et se fixe à la séquence ARE [259]. Cette séquence est présente sur un grand nombre de gènes tels que les gènes de phase II (ex: glutathion S-transférase (GST) ou la quinone oxydoréductase (NQO-1)) impliqués dans la réponse au stress oxydatif [285]. Nrf2 à l'état basal est maintenu dans le cytosol et est constamment dégradé par son inhibiteur INrf2 (Keap-1) qui fonctionne comme un adaptateur pour sa dégradation par le protéasome [259]. Suite à un stress oxydatif (ex : Reactive Oxygen Species (ROS), UV...), le mécanisme de rétention de Nrf2 au cytosquelette est inactivé permettant ainsi sa translocation au noyau. Par la suite, la fixation de Nrf2 à la séquence ARE induit l'expression de l'HO-1.

D'autres facteurs de transcriptions tels qu'AP-1,AP-2 ou NF- κ B ont été décrits comme induisant l'expression de l'HO-1 [286]. Le facteur de transcription AP-1 est un dimère composé de la protéine c-jun et de la protéine c-fos reliées entre elles par une glissière à leucine (leucine zipper) [287]. Il a été démontré que de nombreux stimuli tels que l'arsénite de sodium, le cobalt chloride ou encore le cobalt protoporphyrine induisent l'expression d'HO-1 via ce facteur de transcription [288]. Enfin, certains stimuli tels que le lipopolysaccharide (LPS) ou encore l'hémine favorisent la translocation du facteur de transcription NF- κ B dans le noyau induisant l'expression de l'HO-1 [289].

De façon antagoniste, le facteur de transcription Bach-1 associé à MafK une protéine de la famille des oncoprotéines Maf, réprime l'expression de l'HO-1 à l'état basal en se fixant

sur la séquence ARE [290]. Suite à un stimulus tel que l'hème, Bach-1 se détache de la séquence ARE permettant la fixation de Nrf2 et la production de l'HO-1 [291]. Ces facteurs de transcription impliqués dans la régulation d'hmox-1 sont modulés en amont par trois grandes voies principales que sont la voie des MPAK et la voie AKT/PKB et PKC. Ces voies de signalisation sont associées à de nombreux récepteurs expliquant ainsi la multitude de stimuli pouvant conduire à l'expression de l'HO-1.

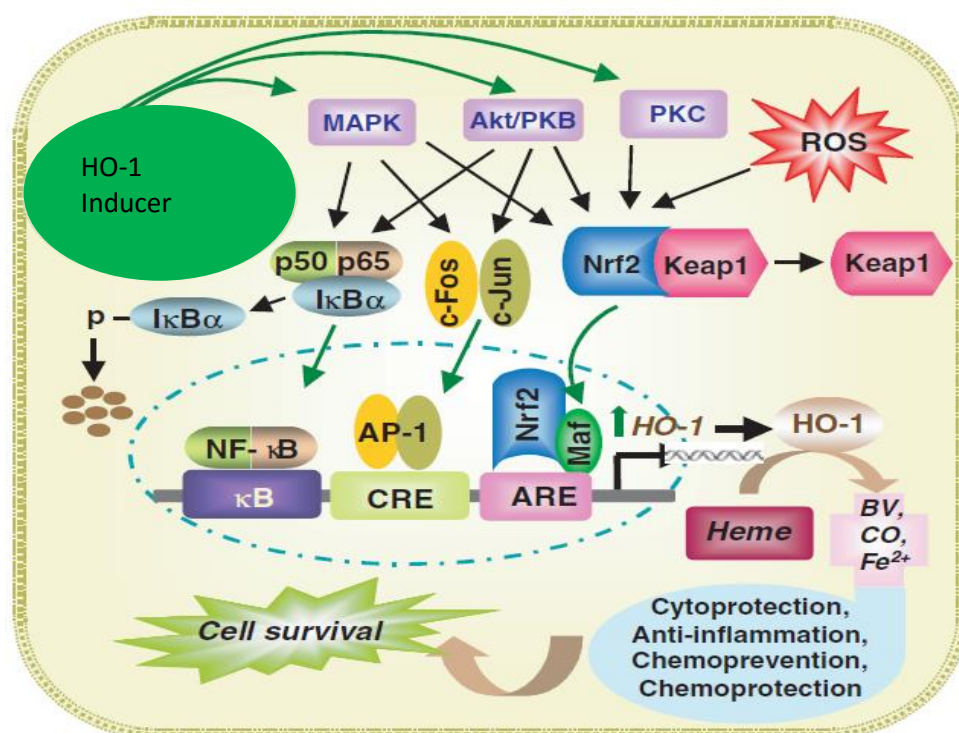


Figure 20: Les différentes voies de signalisation et facteurs de transcription impliqués dans l'induction de l'HO-1. D'après [292]

3.1.5 Régulation de l'expression de l'HO-1 par des miRNA :

La découverte en 1993 de molécule d'ARN non codant appelé miRNA a permis de mettre à jour l'identification d'un nouveau mécanisme de régulation de l'expression génique [293]. Les miRNA sont des petites molécules d'ARN non codant pouvant se fixer par complémentarité de bases nucléiques avec des ARN messager(ARNm). Ces dernières peuvent alors inhiber ou induire la traduction de l'ARNm en protéine.[294].

Un premier niveau de régulation par les miRNA de l'expression d'HO-1 se fait par la modulation de l'expression de certains facteurs de transcription impliqués dans la régulation d'hmox-1. Ainsi, il a été démontré que le miR-155 dans des cellules endothéliales humaines inhibe la traduction de Bach-1 en protéine, levant *de facto*, l'inhibition qu'il exerce sur hmox-1.[295]. Le deuxième niveau de régulation de l'expression d'HO-1 par les miRNA se fait au niveau post-transcriptionnel. Des analyses *in silico* ont permis la mise en évidence de séquences de régulation sur l'ARNm de l'HO-1 par des miRNA (<http://www.microrna.org/microrna/getGeneForm.do>). Il a ainsi été démontré que dans des cellules endothéliales humaines traitées à l'hémine et transfectées avec le miR-377 et miR-217 le niveau d'expression protéique de l'HO-1 est significativement réduit par rapport à celui détecté dans les cellules contrôles [296]. Il est à noter que le niveau d'expression de l'ARNm n'est pas modifié, mettant en évidence une régulation post transcriptionnelle de l'HO-1.

3.1.6 Les différentes classes d'inducteurs de l'HO-1 :

Les inducteurs de l'HO-1 sont très nombreux et de nature variée. Il est possible de les classer en quatre grandes classes selon leur nature [250].

La première classe correspond aux inducteurs dits phytochimiques comme le curcumin ou le carnosol. Il a ainsi été rapporté que le curcumin permet l'induction de l'HO-1 dans des cellules épithéliales rénales en dissociant le complexe Nrf2-Keap-1 et en facilitant la fixation de Nrf2 à la séquence ARE présent sur hmox-1 [297]. De plus, cette activation semble associée à l'activation de la voie de signalisation P38 MAPK.

La deuxième classe d'inducteurs sont les lipides tels que la *15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ2* ou encore la lipoxine A. Il a été démontré que la *15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ2* induit l'expression de l'HO-1 via l'activation des voies de signalisation MAPK, JNK et PI3K/AKT permettant l'activation de Nrf2 [298].

La troisième classe d'inducteurs de l'HO-1 sont les peptides tels que le Facteur Natriurétique Auriculaire (FNA) [299] ou encore l'adrenomedulline. De façon intéressante, l'induction de l'HO-1 par le FNA fait intervenir différentes voies de signalisation en fonction du type cellulaire. Ainsi, il a été rapporté que le FNA induit l'HO-1 dans des cellules épithéliales rénales via la voie de signalisation dépendant du monoxyde d'azote [299] alors que ce dernier induit l'HO-1 via l'activation de la voie de signalisation JNK/AP-1 et ERK dans des cellules endothéliales [300]. La dernière et quatrième classe regroupe l'ensemble des autres inducteurs de natures diverses et variées. Ainsi des composants tels que la rapamycine, les statines ou encore les métalloporphyrines sont décrits comme étant inducteurs de l'HO-1 [301].

3.1.7 Modulation de l'expression de l'HO-1 par les métalloporphyrines :

Les métalloporphyrines sont des régulateurs de l'HO-1 particulièrement efficaces. Elles sont composées d'une porphyrine et d'un ion métallique [251]. On parle de groupement prosthétique correspondant à l'association d'une molécule organique non protéique maintenue dans une structure protéique. Ainsi, l'hème, substrat de l'HO-1 est une métalloporphyrine composée d'un anneau organique (porphyrine) contenant en son centre un atome de Fer. La capacité de ces composants à moduler l'expression de l'HO-1 ont été mises en évidence par Maines *et al* [302] ainsi que Drummond et Kappas [303]. Dans ces études, ils démontrent que les métalloporphyrines sont associées à une induction de l'expression de l'HO-1 mais qu'une grande majorité d'entre elles bloquent son activité enzymatique [302]. En effet, le ZnPP (Zinc+protoporphyrine), le SnPP (Etain+protoporphyrine) ainsi que le MnPP (Manganèse+ protoporphyrine) ont été décrits pour avoir une meilleure affinité de liaison que l'hème à l'HO-1 avec un Km de 0.24µM pour le SnPP contre 0.67µM pour l'hème. De plus, ces métalloporphyrines, à la différence de l'hème, ne peuvent être dégradées par l'HO-1 car elles ne sont pas sensibles à l'oxydation. Ce sont donc des inhibiteurs compétitifs de l'activité de l'HO-1[304]. Cependant, il a été décrit que le CoPP est l'une des seules métalloporphyrines à induire l'expression de l'HO-1 sans affecter l'activité enzymatique de cette dernière. Il a été démontré que l'induction de l'HO-1 par le CoPP dans une lignée de cellules hépatiques humaines est associée à une dégradation de la protéine Bach-1 et une diminution de la dégradation de Nrf2 par le protéasome [305].

3.2 l'HO-1 et son rôle dans la cytoprotection cellulaire :

C'est l'équipe de R.Tyrrel qui fut la première en 1994, à mettre en évidence que l'induction de l'HO-1 dans une culture de fibroblastes humains induisait une réponse cytoprotectrice au stress oxydatif [260]. Suite à cette découverte, de nombreuses études se sont attachées à comprendre les mécanismes moléculaires de cette cytoprotection.

3.2.1 Les propriétés anti-oxydantes de l'HO-1 :

L'équipe de Tonegawa.S [306] fut la première à mettre évidence le rôle anti oxydant de l'HO-1. Ils ont ainsi démontré que des fibroblastes embryonnaires provenant de souris KO pour hmox-1 soumis à un agent pro-oxydant (ex: Hémine ou peroxyde d'hydrogène) présentent une accumulation plus importante de radicaux libres que les cellules contrôles. De nombreux papiers ont par la suite démontré le rôle bénéfique de l'induction d'HO-1 dans des pathologies où le stress oxydatif joue un rôle prépondérant telles que l'ischémie reperfusion ou l'athérosclérose [307].

Même si les mécanismes par lesquels HO-1 exerce cette fonction restent mal connus, la dégradation de l'hème pourrait représenter un des mécanismes possibles [308]. En effet, l'hème sous forme libre c'est-à-dire lorsqu'elle n'est pas associée à une hémoprotéine (ex : partie protéique de hémoglobine) peut conduire au travers de la réaction de Fenton (figure 21) à une réaction d'oxydation faisant intervenir les ions ferreux et les peroxydes d'hydrogène conduisant à la formation de radicaux libres [309]. Une fois accumulés dans la cellule ces radicaux libres génèrent des ROS qui, en quantité importante détruisent l'ADN et les protéines aboutissant à la mort cellulaire [310]. La dégradation de l'hème par l'HO-1 limite donc cette source d'agents pro-oxydants [311]. De plus, la formation de biliverdine rapidement convertie en bilirubine présente des propriétés antioxydantes en inhibant l'enzyme NADPH oxydase qui est impliquées dans la ROS [312]. Enfin, il a été mis

en évidence que l'HO-1 après un clivage de sa région C terminale peut se transloquer au niveau du noyau permettant ainsi l'activation de facteur de transcription tel qu'AP-1 impliqué dans la régulation de gènes contre le stress oxydatif [273].

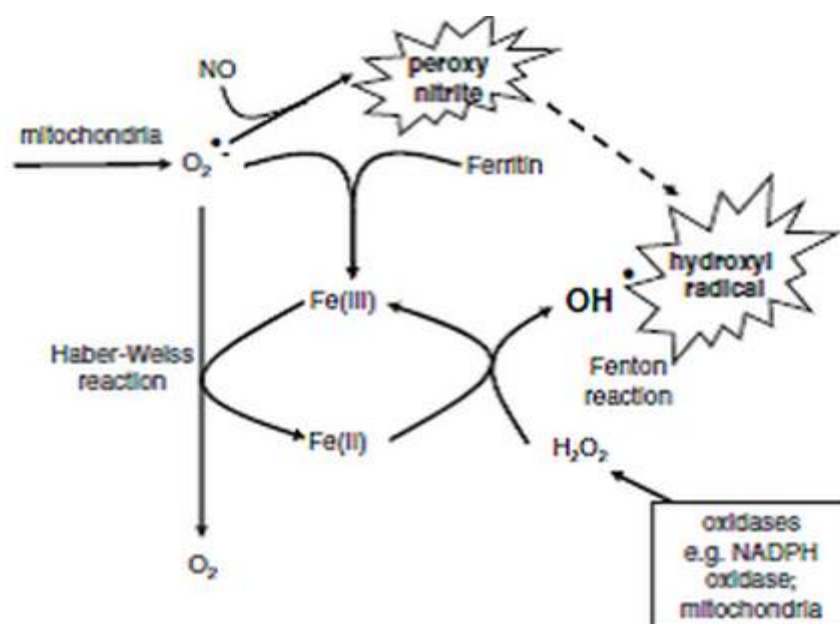


Figure 21: Réaction de Fenton. d'après le site biomedcentral.com

3.2.2 Les propriétés anti-apoptotiques de l'HO-1 :

Outre ses actions anti-oxydantes, l'HO-1 permet aux cellules qui l'expriment de lutter contre l'apoptose (figure 22). L'apoptose peut être induite par de nombreux agents toxiques notamment la lymphotoxine ou le Tumor Necrosis Factor (TNF). Il a été démontré que l'induction de l'HO-1 dans des cellules endothéliales traitées au TNF diminue de façon significative leur mort par apoptose [252]. Cette cytoprotection s'accompagne d'une diminution de l'expression de gènes pro-inflammatoires codant pour des molécules d'adhésion telles que VCAM-1 et E-selectine, et s'explique par une modulation négative du

facteur nucléaire NF-κB [313]. Ces résultats mettent en avant que le facteur de transcription NF-κB perd sa capacité à activer les gènes pro-inflammatoires tout en conservant sa capacité à induire les gènes anti-apoptotiques. Les mécanismes par lesquels l'HO-1 module négativement NF-κB sans affecter sa capacité à induire des gènes anti-apoptotiques reste à déterminer.

Outre, la régulation de NF-κB, l'effet cytoprotecteur de l'HO-1 est fortement associé à la génération de CO régulant la voie de signalisation p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPKinase). En effet, l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques des isoformes P38α et P38β isoformes, respectivement pro et anti-apoptotique, supprime les effets anti-apoptotiques du CO [314]. L'induction de l'HO-1 entraîne la dégradation de l'isoforme pro-apoptotique P38α, protégeant la cellule d'une mort par apoptose [315].

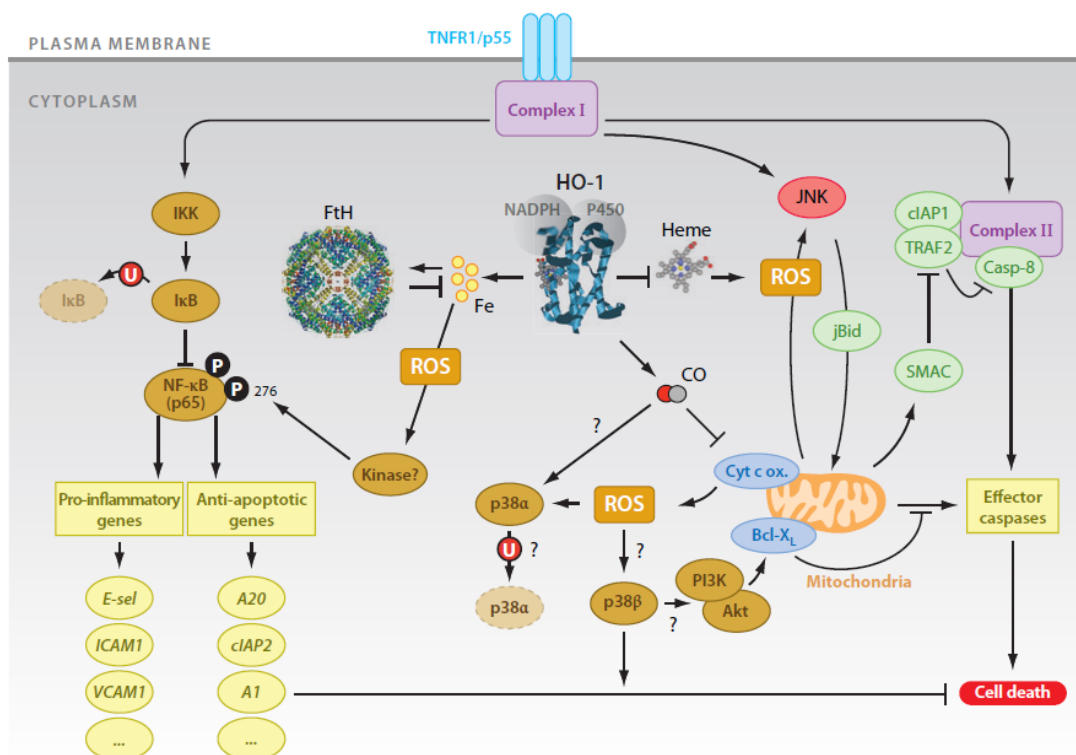


Figure 22: Mécanismes cytoprotecteurs médiés par l'HO-1. D'après [262]

3.3 Rôle de L'HO-1 dans la régulation du système immunitaire :

3.3.1 L'HO-1 une enzyme anti-inflammatoire :

C'est l'équipe de Willoughby qui fut la première en 1996 à mettre en évidence le rôle de l'HO-1 dans la résolution du processus inflammatoire [263]. Dans un modèle de pleurésie aiguë chez le rat induite par l'injection de carrageenin ils ont mis en évidence une augmentation de l'activité de l'HO-1 lors de l'inflammation (à 24 heures) avec un pic lors de la phase de résolution (à 48 Heures). L'injection d'un inhibiteur de l'activité de l'HO-1 le SnPP, 24H après l'induction de l'inflammation est associée à une augmentation significative du volume d'exsudat récupéré au pic de l'inflammation, démontrant le rôle bénéfique de l'activité de l'HO-1 dans la résolution de l'inflammation. De plus, l'injection d'un inducteur de l'HO-1 18H avant l'induction de l'inflammation est associée à une diminution significative du nombre de leucocytes dans la cavité pleurale ainsi qu'une diminution significative du volume d'exsudat récupéré, démontrant le rôle immunosuppresseur de l'HO-1. Le lien entre inflammation et l'HO-1 est confirmé quelques années plus tard par un «case report » décrivant que, l'absence de l'HO-1 liée à une mutation de hmox-1 chez l'homme, conduit à un état inflammatoire généralisé s'avérant létal [316].

Par la suite, il a été démontré que l'IL-10 chez la souris, induit l'expression de l'HO-1 dans les macrophages et que l'activité enzymatique de cette dernière est nécessaire aux propriétés anti-inflammatoires de l'IL-10. Ainsi une lignée de macrophages de souris (J774) traitée avec des doses croissantes d'IL-10 (0 à 40 ng/ml) présente une augmentation dose dépendante de l'expression de l'HO-1. De plus, il démontre que l'IL-10 induit l'expression de l'HO-1 via la voie de signalisation P38 MAPK. Afin de mettre en évidence le rôle de l'HO-1 dans les propriétés anti-inflammatoires de l'IL-10, l'expression de l'HO-1 par les

macrophages a été inhibée avec un oligodésoxynucléotides antisens complémentaire de l'ARNm de l'HO-1. Les macrophages transfectés et traités avec du LPS et de l'IL-10 présentent un niveau de sécrétion de TNF- α significativement plus élevé que les macrophages transfectés avec un oligodésoxynucléotides contrôle, mettant en évidence le rôle de l'HO-1 dans les propriétés anti-inflammatoires de l'IL-10 [317].

L'effet anti-inflammatoire de l'HO-1 a rapidement été associé au CO un des trois produits de dégradations de l'HO-1.

Il a ainsi été démontré que le traitement au CO d'une lignée de macrophages de souris (RAW 264.7) activés au LPS entraîne la diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et le TNF- α et l'augmentation de la sécrétion de l'IL-10, cytokine anti-inflammatoire. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* dans un modèle de souris traitées au LPS et incubées avec du CO où le niveau de sécrétion dans le sérum de TNF- α est significativement diminué et celui de l'IL-10 significativement augmenté comparé aux souris non exposées au CO.

Les effets anti-inflammatoires du CO se trouvent associés à la voie de signalisation P38 MAPK (*protéine kinase activée par un mitogène*) [318]. Il a été démontré que l'effet anti-inflammatoire du CO sur les macrophages est associé à une inhibition des voies de signalisation dépendantes du TLR 2,4,5 et 9 ainsi qu'à un défaut de recrutement du TLR4 au niveau de radeaux lipidiques à la surface des macrophages, suite à une stimulation au LPS[319]. De plus, les effets anti-inflammatoires du CO ont été confirmés chez le primate non humain (*cynomolgus macaques*) dans un modèle d'inflammation pulmonaire par administration de LPS [320]. Il a ainsi été mis en évidence que l'inhalation préventive de CO (500ppm pendant 6H) réduit de façon significative l'infiltrat de neutrophiles au niveau pulmonaire comparé au contrôle. Cependant, il est précisé que la dose utilisée pour obtenir un effet anti-inflammatoire se doit d'être plus élevée que chez le rongeur (250ppm) et que pour de telles concentrations un niveau élevé de carboxyhémoglobine, complexe de

monoxyde de carbone et d'hémoglobine inhibant la délivrance de l'oxygène est détecté (sup à 30%) donc incompatible avec une application clinique chez l'homme. Ces résultats mettent en avant des différences inter-espèces et donc la difficulté d'utiliser le monoxyde de carbone comme outil thérapeutique.

Dans une étude utilisant un modèle de choc septique par administration de LPS chez le rat, il a été démontré que la biliverdine, autre produit de dégradation de l'HO-1, présente des propriétés anti-inflammatoires [321]. En effet, l'administration de biliverdine avant l'injection d'une dose létale de LPS chez ces rats améliore de façon significative leur survie qui passe de 20 à 87%. Cette amélioration s'accompagne d'une diminution de la perméabilité pulmonaire, d'une diminution de la sécrétion d'IL-6, cytokine pro-inflammatoire, et d'une augmentation de la sécrétion d'IL-10.

3.3.1.1 Régulation de l'inflammasome par l'hème-oxygénase-1 :

L'inflammasome est un complexe multiprotéique intracellulaire qui détecte les pathogènes ou stress stérile et induit la production de IL-1 β et d'IL-18, cytokines pro-inflammatoires. Ce complexe est exprimé par la lignée granulocytaire et est formé de NLR qui sont des récepteurs de l'immunité innée de la famille des PRR ainsi que d'autres protéines telles que la protéine caspase-1 et la protéine adaptatrice ASC. La dérégulation de ce complexe est associée à de nombreux syndromes auto-inflammatoires appelé syndrome périodique associé à la cryopyrine [322]. La cause commune de ces maladies est une mutation dans le gène codant pour la protéine NLRP3 prenant part au complexe formant l'inflammasome. (Cf schéma). Une étude récente a mis en évidence que l'induction de l'HO-1 joue un rôle anti-inflammatoire en inhibant l'expression des protéines NLRP3, caspase-1 et ASC impliquées dans la formation de l'inflammasome [323]. Il a ainsi été démontré chez la souris dans un modèle de septicémie induite par ligature caecale et ponction (CLP) qu'un pré-traitement à l'hémine réduit de façon significative les lésions pulmonaires associées à

une diminution de l'infiltration de neutrophiles et de la sécrétion d'IL-1b et d'IL-18 au niveau tissulaire et sérologique. De plus, ils mettent en évidence une diminution significative du nombre de cellules exprimant NLRP3 après pré-incubation avec l'hémine, comparé aux souris CLP non traitées ainsi qu'une diminution de l'expression des protéines NLRP3, caspase-1 et ASC au niveau du tissu pulmonaire. Cependant, la quantification de l'expression des protéines de l'inflammasome effectuée par western blot ne permet pas de déterminer si la différence d'expression observée est juste liée au nombre plus faible de cellules infiltrantes ou à un réel effet de l'HO-1 sur l'expression de ces protéines.

Le CO semble également moduler l'inflammasome mais les effets décrits sont contradictoires. En effet, dans l'étude de Jung *et al* [324] le CO inhibe la formation de l'inflammasome dans des macrophages stimulés au LPS alors que dans l'étude de Wegiel *et al* [325] il favorise la formation de l'inflammasome dans des macrophages infectés par des bactéries.

3.3.2 Immunorégulation de l'HO-1 :

3.3.2.1 Modulation des lymphocytes par l'HO-1 :

L'étude de Kapturczak *et al* [326] est l'une des premières études à décrire par quels mécanismes l'HO-1 module la réponse immune en s'appuyant sur une analyse phénotypique de souris KO pour l'HO-1. Il a ainsi été démontré qu'en l'absence de l'HO-1 les LT et LB présentent une distribution tissulaire anormale dans la rate n'étant respectivement plus localisés en région centrale et dans la zone marginale. De plus, une élévation significative de la sécrétion d'IgM est observée comparée aux souris contrôles suggérant un défaut d'activation des LB et donc une absence de commutation isotypique. Les LT isolés de souris KO pour l'HO-1 et activés avec l'anti CD3/CD28 présentent un phénotype Th1 (pro-inflammatoire) avec une augmentation significative de la sécrétion d'IL-6, IFN- γ et TNF- α .

Ces résultats montrent l'importance de l'HO-1 dans l'homéostasie lymphocytaire. De plus, une étude réalisée sur des LTCD4 humains [327] a mis en évidence que l'induction de l'HO-1 après un traitement au CoPP diminue leur capacité proliférative suite à une stimulation CD3/CD28 par rapport aux cellules non traitées. Ces effets ont été reproduits après traitement des LTCD4 avec du CO et sont associés à une diminution significative de la production d'IL-2, cytokine jouant un rôle clé dans la prolifération des LT, ainsi qu'à une inhibition spécifique de la voie de signalisation ERK. De plus, il a récemment été mis en évidence que l'inhibition de l'expression de l'HO-1 dans des LT isolés de patients séropositifs pour le LCMV augmente leur réponse anti-virale [328]. Ainsi, des PBMC de patients séropositifs pour le LCMV sont activés par l'ajout d'un peptide dérivé du LCMV (A02pp65) et sont traités ou non avec un inhibiteur de l'HO-1 le SnMP ou un inducteur le CoPP. La prolifération des LT est analysée par FACS et met en évidence une augmentation de la prolifération des LT traités avec le SnMP par rapport aux cellules traitées avec le peptide seul. A l'inverse les LT traités avec le CoPP ont une prolifération diminuée. Cependant, même s'il est précisé que la maturation des DC ne semble pas affectée par les traitements au CoPP et au SnMP, il reste néanmoins difficile d'exclure de façon certaine, une action de ces derniers sur les CPA, pouvant expliquer cette différence de prolifération.

Le rôle de l'HO-1 dans la fonction des LT régulateurs reste à ce jour très controversé. Il a été démontré que l'HO-1 est exprimée de façon constitutive par les LT régulateurs CD4+ CD25+ [329]. Dans cette étude, il a été démontré que la transfection de cellules T (Jurkat) avec le facteur de transcription FoxP3 permet l'induction de l'HO-1 et que la fonction suppressive de ces LTreg est dépendante de l'activité de l'HO-1. Cependant, le rôle de l'HO-1 dans la fonctions suppressive des lymphocytes T reg semble être écarté par une étude utilisant des souris KO pour l'HO-1 mettant en évidence que l'inhibition de l'HO-1 n'affecte pas la fonction suppressive et le développement des LTregs [330]. Toutefois, il a été mis en évidence que l'HO-1, de manière indirecte, est nécessaire à la fonction suppressive des LTregs. En effet, il a été démontré que l'absence de l'expression d'HO-1 dans des cellules

présentatrices d'antigènes est associée à une perte de la fonction suppressive des LTregs [331].

3.3.2.2 Modulation des macrophages par l'HO-1 :

Chez l'homme il a été mis en évidence que les macrophages de type M2 expriment préférentiellement les gènes codant pour la protéine CD163 et l'HO-1 [333]. Cette dernière est, ainsi que nous allons le voir à présent, importante dans la fonction des macrophages. Il a été démontré que l'HO-1 est associée aux propriétés tolérogènes observées chez des macrophages traités avec une dose submicromolaire de 15-Deoxy- \cdot 12,14-prostaglandin J2 [334]. En effet, les propriétés immunosuppressives des macrophages sont diminuées suite à l'ajout d'inhibiteur de l'HO-1 ou de chélateur de CO. De même, les propriétés anti-inflammatoires d'une substance utilisée en médecine traditionnelle asiatique, le sulfuretin de *Rhus verniciflua* Stokes, sont médiées par l'induction de l'HO-1 dans les macrophages [335]. Cependant, il est important de préciser que ces substances bien qu'elles induisent l'HO-1 peuvent moduler l'expression d'autres gènes pouvant jouer un rôle dans le phénotype observé. Il serait donc intéressant de reproduire ces expériences dans des souris KO pour l'HO-1 et analyser si les mêmes effets sont observés sur la fonction des macrophages. Une étude récente a comparé la sévérité d'une colite expérimentalement induite, entre des souris « sauvages » (WT) et des souris *Bach1*^{-/-} (facteur de transcription réprimant l'expression d'HO-1) [336]. Il a ainsi été montré que la colite expérimentale est inhibée chez les souris *Bach1* KO, et que cette protection se retrouve chez des souris WT ayant reçu l'injection de macrophages provenant de souris *Bach1*^{-/-}. L'analyse de ces macrophages montre une augmentation de l'expression d'HO-1 et une expression de marqueurs de type M2 tels que l'Arginase-1, Fizz-1, Ym1 et MRC1. Ces résultats renforcent l'hypothèse du rôle immunosuppresseur de l'HO-1 dans la fonction des macrophages et suggèrent un rôle de cette dernière dans la polarisation des macrophages en type M2. Cependant, *Bach1* est impliqué dans la régulation d'autres gènes qu'*hmox-1* et les effets observés pourrait être liés

à la modification de la régulation de ces autres gènes. Outre les effets sur la fonction suppressives des macrophages, il a été démontré que l'expression de l'HO-1 dans ces derniers est aussi importante pour la réponse anti-bactérienne [337]. En effet, l'étude de souris ayant subi un KO conditionnel pour le gène *hmx-1* au niveau des macrophages, a mis à jour le rôle majeur de l'HO-1 dans la réponse associée à l'IFN- β . Les macrophages provenant de ces souris activées via le TLR-3 et 4 présentent un défaut de production de l'IFN- β . *In vivo*, cela se traduit par un défaut de la réponse anti-bactérienne suite à une infection à la *listeria monocytogenes*. L'expression de l'HO-1 dans les macrophages semble également avoir un rôle sur leur développement [338]. En effet, une étude récente de Baltimore *et al* a révélé un défaut de développement des macrophages provenant de souris double KO pour le gène de HO-1 et Bach-1 (son répresseur transcriptionnel) mettant en avant le rôle clé de la voie de signalisation Bach1/HO-1 dans le développement des macrophages. Le niveau d'expression ou encore les stimuli conduisant à l'expression de l'HO-1 sont autant de facteurs pouvant expliquer les effets parfois antagonistes de l'HO-1 sur la fonction des macrophages.

3.3.2.3 Modulation des cellules dendritiques par l'HO-1 :

La première étude à avoir mis en évidence la modulation de la fonction des cellules dendritiques par l'HO-1 est une étude de Chauveau C *et al* (figure 23) [339]. Il a ainsi été démontré qu'un certain sous-type de DCs immatures (pDCs, ou DC dérivées de la moelle osseuse) isolées de rat et des DCs immatures dérivées de monocytes chez l'homme expriment spontanément l'HO-1. La maturation de ces dernières par du LPS ou CpG est associée à une diminution de l'expression de l'HO-1. De plus, l'induction préventive de l'HO-1 par du CoPP dans ces DCs immatures puis l'activation avec du LPS sont associées à une inhibition de la maturation se traduisant au niveau phénotypique par une diminution de l'expression de molécules d'activations tels que CD86, ICAM-1 ou encore le CMHII comparé

aux cellules contrôles. Le profil cytokinique de ces DCs immatures traitées au CoPP et activées LPS est aussi affecté présentant une diminution de l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12 p40, l'IL-6 ou encore le TNF- α et un niveau similaire de production d'IL-10 cytokine anti-inflammatoire comparé aux DCs contrôles. Ce phénotype s'accompagne, d'un point de vue fonctionnel, par une diminution de leur capacité à induire une prolifération alloréactive de lymphocytes T mettant en évidence le rôle immunorégulateur des DCs exprimant l'HO-1. Cependant, les effets de l'inhibition de la maturation des DCs par des inducteurs pharmacologiques de l'HO-1 tel que le CoPP sont remis en question par l'étude de Mashreghi *et al* [340]. En effet, il est mis en évidence que des DCs traitées avec un siRNA spécifique de l'HO-1 et activées au LPS présentent toujours un défaut de maturation et une capacité réduite à induire une prolifération alloréactive de lymphocytes T. Il démontre que l'inhibition de la maturation des DCs par le CoPP est indépendante de l'expression de l'HO-1 et dépendante de l'activation de STAT 3. Cependant, dans cette étude, l'analyse par western blot de l'expression de l'HO-1 dans des DC traitées conjointement avec le siRNA spécifique de l'HO-1 et du CoPP montre clairement une expression résiduelle de l'HO-1. Au regard de ces résultats, il est donc difficile d'exclure de manière certaine le rôle de l'HO-1 dans l'inhibition de la maturation des DC par le CoPP. Le traitement de DC issues de souris KO pour l'hmox-1 présenterait un moyen plus efficace pour exclure ou non le rôle de l'HO-1 dans l'inhibition de la maturation des DC.

De plus, il a été démontré que le CO produit de dégradation de l'HO-1 peut aussi inhiber la maturation des DCs renforçant l'hypothèse d'un rôle de l'HO-1 dans la modulation des DCs. Ainsi, une étude complémentaire de notre groupe a montré que le traitement de DCs humaines dérivées de monocytes par le CO reproduit les effets d'inhibition de la maturation observée par l'induction d'HO-1 via le CoPP. Cette inhibition de maturation est associée à une activation de la voie de signalisation IRF-3. De plus, dans un modèle de diabète induit par l'administration de DCs activées au LPS et chargées avec un antigène exprimé par les cellules β du pancréas, il a été démontré que des DCs traitées avec un

inducteur de l'HO-1 ou du CO perdent leur capacité à induire le diabète. Ces résultats démontrent que l'inhibition de la maturation des DCs par l'induction de l'HO-1 ou le traitement au CO est associée à une diminution de leur immunogénicité *in vivo* [341]. De plus, le CO inhibe la fusion entre le lysosome tardif et le lysosome résultant d'une diminution de la capacité des DCs à cross présenter un antigène soluble (OVA) à des lymphocytes T, diminuant leur capacité à activer les LTCD8 [342]. Ces études mettent en évidence que l'induction de l'HO-1 ou ses produits de dégradation dans les DCs leur confèrent des propriétés tolérogènes. De plus, une étude récente de notre groupe a mis en évidence que l'injection de DCs traitées au CO et chargées avec un auto-antigène inhibe le développement du DT1, dans un modèle de souris transgéniques. Les résultats de cette étude montrent que le traitement des DCs au CO protège les souris de l'induction du diabète de façon antigène spécifique. Cette protection par les DCs traitées au CO est due à une inhibition de la migration des lymphocytes T CD8+ auto-réactifs au niveau du pancréas. Suite à la rencontre avec les DCs traitées au CO, les lymphocytes T CD8+ auto-réactifs présentent une expression fortement réduite de l'intégrine $\beta 1$ [343]. Ces résultats mettent en avant la capacité des DC, rendues tolérogènes par les produits de dégradation de l'HO-1 à inhiber de façon antigène spécifique l'activation de LTCD8 naifs. De façon antagoniste, une étude récente a mis en évidence que l'inhibition de l'expression de l'HO-1 dans des DC immatures dérivées de moelle osseuse de souris inhibe leur capacité endocytaire et augmente leur capacité à activer les LTCD8 [269]. Ces résultats suggèrent que la modulation de l'expression de l'HO-1 dans les DCs est un moyen efficace de modifier la fonction des DCs

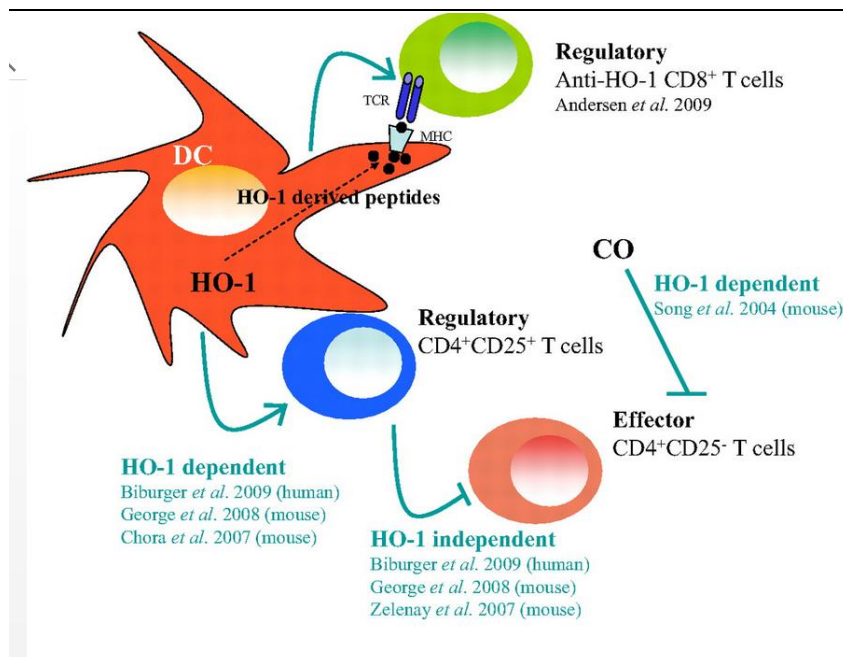


Figure 23 : Modulation des DC par l'HO-1. D'après [344]

3.4 Tolérance immunitaire par induction de l'HO-1 :

De par ses propriétés anti-inflammatoires et immunorégulatrices l'HO-1 s'avère être une cible thérapeutique d'intérêt dans le développement de stratégie d'induction de tolérance immunitaire. Ainsi de nombreuses équipes ont évalué son potentiel dans le traitement des maladies auto-immunes [345].

3.4.1 L'induction systémique de l'HO-1 dans la SEP et l'EAE :

L'étude de Schluesener *et al.* est l'une des premières études à mettre en évidence que le développement de l'EAE est associé à une augmentation de l'expression de l'HO-1 au niveau du SNC [346]. Liu *et al* précise que dans un modèle d'EAE chez le rat les cellules exprimant principalement l'HO-1 sont des macrophages. De plus, il démontre que l'induction

systemique de l'HO-1 en préventif par une injection quotidienne pendant 10 jours d'hémine permet de diminuer la sévérité de la maladie et qu'à l'inverse, l'inhibition de l'HO-1 a des effets aggravants [347]. Quelques années plus tard ces résultats sont confirmés par une étude utilisant un modèle de souris KO pour l'HO-1 [348]. Il démontre que ces souris KO développent une forme plus sévère de l'EAE comparé aux souris sauvages, confirmant le rôle protecteur de l'HO-1. De plus, l'induction systémique de l'HO-1 en curatif avec du CoPP permet de reverser la paralysie des souris. La protection s'accompagne d'une diminution de l'infiltration du système nerveux central (SNC) par les LTCD4+ ayant une capacité proliférative et une sécrétion d'IL-2 et d'IFN- γ diminuée. D'un point vue mécanistique, ils associent ces effets à l'expression de l'HO-1 dans les CPA. Il démontre par une expérience *in vitro* que des CPA isolées de souris traitées au CoPP ne sont plus en mesure de réactiver correctement des LTCD4 déjà primés avec le pMOG et que ce défaut de réactivation est associé à une diminution de l'expression du CMH de classe II à la surface des DC. De façon intéressante, un traitement au CoPP dans des souris KO pour l'HO-1 s'avère inefficace pour inhiber le développement de l'EAE, démontrant que le rôle protecteur du CoPP est médié par l'HO-1. Chez l'homme il a été mis en évidence que des patients atteints de SEP présentent au niveau des cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) un niveau d'expression de l'HO-1 plus faible lors des phases de rechute. Ils observent que lorsque les patients sont traités avec des corticostéroïdes, le niveau d'expression de l'HO-1 retourne à la normale au niveau des PBMC. Les corticostéroïdes étant des inducteurs d'HO-1 il suggère qu'un des effets bénéfiques des corticostéroïdes sur le développement de la SEP pourrait être lié à l'induction de l'HO-1 [349].

3.4.2 L'induction systémique de l'HO-1 dans le DT1 :

L'étude de Hu *et al* est l'une des premières études à mettre en évidence le rôle bénéfique de l'induction de l'HO-1 dans un modèle de souris (NOD) développant spontanément le diabète. En effet, l'administration d'un Adeno-associated virus (AAV) contenant le gène *hmx-1* est associé à une réduction significative de l'infiltration de leucocytes au niveau des îlots de Langerhans, qui se traduit par une diminution de l'incidence du diabète. L'induction systémique de l'HO-1 est associée à un niveau plus faible d'expression de cytokines telles que l'IFN- γ et l'IL-2 détectées au niveau du sérum. De plus, il est mis en évidence que les LT isolés des souris traitées avec l'AAVHO-1 et transférés dans une souris NOD SCID n'ayant plus de LT, LB et NK sont moins diabétogènes. De façon intéressante, il démontre que le traitement des souris NOD avec du CO inhibe aussi le développement du DT1 et est associé à une diminution de la sécrétion d'IFN- γ et l'IL-2 au niveau du sérum. Ces résultats suggérant un rôle du CO dans la protection observée suite à l'induction systémique de l'HO-1 [350]. De plus, Li *et al* démontre que l'induction systémique de l'HO-1 en curatif par administration de CoPP en I.P chez la souris NOD est associée à un retour à une normoglycémie après trois semaines de traitement. Cependant, il est important de noter que, dans cette étude, aucune courbe d'incidence n'est présentée, rendant difficile l'interprétation de cette observation. Associée à cette protection, une diminution significative de l'infiltration des LT CD8⁺ ainsi que des DC CD11c⁺ au niveau des îlots de Langerhans est observée. Il est mis en évidence que l'induction de l'HO-1 par le CoPP s'accompagne d'une augmentation de l'expression de Bcl-xL et pAKT, protéines anti-apoptotiques au niveau des cellules β . Ces résultats mettent en avant le rôle cytoprotecteur de l'HO-1 au niveau des îlots pancréatiques [351]. De plus, une étude a mis en évidence que l'induction de l'HO-1 avec du curcumin au niveau des îlots de Langerhans augmente leur sécrétion d'insuline. Ces résultats soulignent les effets aspécifiques d'une induction systémique de l'HO-1. Cette observation est confirmée par une autre étude montrant que l'inhibition de l'HO-

1 par un inhibiteur chimique le stannus mesoporphyrin (SnMP) est associée à une diminution de la sécrétion d'insuline. Ces résultats démontrent le rôle bénéfique de l'HO-1 sur la fonction des cellules β [352]. L'ensemble de ces études montrent que l'induction systémique de l'HO-1, par sa capacité à réprimer la réponse immunitaire et par ses propriétés cytoprotectrices, représente une stratégie efficace pour traiter les maladies auto-immunes. Cependant, une telle stratégie semble difficilement applicable en clinique du fait des actions aspécifiques de l'HO-1. De plus, une induction prolongée de l'HO-1 pourrait conduire à une dérégulation du métabolisme de l'hème pouvant avoir des effets néfastes sur l'organisme [353].

Projet de recherche

Projet de recherche :

Le système immunitaire dispose d'un grand nombre de mécanismes tolérogènes (délétion clonale, anergie, ignorance) lui permettant d'inhiber le développement d'une réponse immune dirigée contre le soi. Lorsqu'un ou plusieurs de ces mécanismes sont défaillants, cela peut conduire comme nous l'avons vu, au développement d'une maladie auto-immune. Ces maladies sont souvent idiopathiques, bien que de nombreuses études aient montré des susceptibilités associées à l'environnement et à la génétique. Face à ces pathologies, les traitements préconisés à l'heure actuelle sont des immunosuppresseurs à spectre large (Cyclophosphamide, Mycophénolate, Glucocorticoïde...). Ces traitements sont efficaces pour endiguer le développement de la maladie mais ont de nombreux effets secondaires indésirables. En effet, la prise à long terme d'immunosuppresseurs augmente considérablement le risque de développer un cancer ou une maladie opportuniste. Une alternative intéressante à ces traitements serait d'inhiber spécifiquement les acteurs immunitaires reconnaissant les auto-antigènes impliqués dans la maladie.

Mon projet de thèse s'inscrit dans cette optique et repose sur les propriétés immunosuppressives d'une enzyme : l'hème oxygénase-1(HO-1). Cette enzyme catalyse la réaction de dégradation de l'hème en monoxyde de carbone (CO), ferritine, bilirubine. L'induction systémique d'HO-1 a montré des effets bénéfiques dans de nombreux modèles animaux de maladies auto-immunes telles que le diabète de type 1, ou l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) [350][348]. Au sein de notre équipe, nous nous intéressons plus particulièrement au rôle d'HO-1 dans les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Nous avons démontré que l'induction de l'expression d'HO-1 par les cellules dendritiques (DCs) entraîne une diminution de leur immunogénicité, ainsi qu'une diminution de la sécrétion de cytokine inflammatoire telle que l'IL-12 [339]. De plus, une étude récemment publiée par notre équipe a évalué l'efficacité de l'injection de DCs traitées au CO

et chargées avec un auto-antigène dans l'inhibition du DT1 chez la souris. Les résultats de cette étude montrent que le traitement des DCs au CO protège les souris de l'induction du diabète de façon antigène spécifique. Cette protection par les DCs traitées au CO est due à une inhibition de la migration des lymphocytes T CD8+ auto-réactifs au niveau du pancréas. Suite à la rencontre avec les DCs traitées au CO, les lymphocytes T CD8+ auto-réactifs présentent une expression réduite de l'intégrine $\beta 1$ [343]. L'ensemble de ces travaux démontre le fort potentiel tolérogénique des DCs exprimant l'HO-1 ou traitées au CO. Ces résultats nous ont conduits à émettre l'hypothèse que des CPA exprimant l'HO-1 et présentant au même moment un auto-antigène pourraient induire une tolérance antigène spécifique *in vivo*. Ainsi, nous avons développé un protocole basé sur l'administration intradermique (ID) d'un inducteur de l'HO-1 et d'un auto-antigène. Nous avons évalué la capacité de ce traitement à inhiber de manière antigène spécifique l'attaque de LTCD8 et CD4 auto-réactifs dans un modèle de DT1 et d'EAE et dans un modèle de DTH chez le primate non humain.

Résultats

Article I

Inhibition antigène spécifique de LT autoréactifs par l'administration intradermique d'un inducteur de l'hème-oxygénase-1 et d'un auto-antigène.

Julien Pogu, Thomas Simon, Séverine Rémy, Frédéric Brau, Jean-François Fonteneau, Sylvie Pogu, Sotiria Tzima, Georges Kollias, Bernard Vanhove, Gilles Blanco, Eliane Piaggio, Ignacio Anegon and Philippe Blancou

Article en soumission dans « Nature Medicine »

Titre original : **Ongoing antigen-specific T responses are inhibited by intradermal co-administration of their cognate antigen and heme oxygenase-1 inducers**

Ongoing antigen-specific T responses are inhibited by intradermal co-administration of their cognate antigen and heme oxygenase-1 inducers

Julien Pogu^{1*}, Thomas Simon^{1,2*}, Séverine Rémy¹, Frédéric Brau³, Jean-François Fonteneau⁴, Sylvie Pogu², Sotiria Tzima⁵, Georges Kollias⁵, Bernard Vanhove¹, Gilles Blancho¹, Eliane Piaggio⁶, Ignacio Anegón^{1¶} and Philippe Blancou^{1,2,3¶}

¹ Université de Nantes, INSERM; UMR1064, Center for Research in Transplantation and Immunology, 44093 Nantes, France;

² INRA USC1383, IECM, Nantes, France; LUNAM Université, Oniris, EA4644, Nantes, France;

³ Université de Nice Sophia Antipolis, CNRS, INSERM; UMR1080, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, 06560 Valbonne, France;

⁴ Université de Nantes, INSERM; UMR892, CNRS; UMR6299, 44007 Nantes, France;

⁵ Institute of Immunology, Biomedical Sciences Research Centre “Alexander Fleming”, Vari, Attica, Greece;

⁶ Institut Curie, INSERM; UMR932, Institut Curie, 75005 Paris, France.

Key words: immune responses, autoimmune diabetes, cytotoxic T-cells, immune tolerance, leukocyte migration, tissue inflammation, primates.

FOOTNOTES

* Co-first authorship

¶ Co-senior authorship

§ Corresponding author: Philippe Blancou, Université de Nice Sophia Antipolis, CNRS, INSERM, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Valbonne, 06560, France. Phone: +33 493 957 782. Fax: +33 493 957 708. Email: blancou@ipmc.cnrs.fr

[RUNNING TITLE:](#) Pathogenic T-cell Tolerization by monocyte-derived dendritic cells

ABSTRACT:

One barrier to treatment of autoimmune diseases is the difficulty of antigen-specific tolerization of ongoing T-cell responses. Heme oxygenase-1 (HO-1) inducers are clinically approved drugs for non immune-related diseases that have shown anti-inflammatory properties. Here we showed that genetic induction of heme oxygenase-1 (HO-1) in antigen-presenting cells lowered diabetes incidence in non-obese diabetic (NOD) mice. Based on this result, we developed a protocol to tolerize on going autoreactive T-cells response in type 1 diabetes (T1D) and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mice models by intradermal co-injection of HO-1 inducer and autoantigen. This treatment induced recruitment in the draining lymph node of an HO-1-overexpressing monocyte-derived DC (MoDC) population that tolerized ongoing autoreactive T-cells responses by impairing their migration capability to the targeted organs. To explore the clinical relevance of this tolerisation protocol, we showed that intradermal injection of a clinically approved HO-1 inducer and antigen in primates extinguish delayed type hypersensitivity (DTH) for at least 2 month. Overall, clinically approved HO-1-inducers represent a promising approach for induction of antigen-specific tolerance in patients suffering from immune-mediated diseases.

INTRODUCTION

Organ-specific autoimmune diseases, including type 1 diabetes (T1D) and multiple sclerosis (MS) are caused by the activation of autoreactive CD4⁺ and CD8⁺ T cells and their accumulation to the targeted organ. One serious challenge of autoimmune diseases treatment is that, at diagnosis, pathogenic T-cells are found in the targeted leaving a narrow therapeutic window for immuno-intervention before irreversible damage are made to the targeted organ ¹. Systemic immunosuppression for example using anti-CD3², anti-CD20³ or costimulation blockade⁴ in diabetes or anti-alpha4 integrine (natalizumab) in MS⁵ represents an important step towards curative treatment of these diseases, as it most likely improves disease by blocking the aggression of the targeted tissues. However, current immunosuppression carry the inherent problem of a lack of specificity, which results in undesirable side effects, such as increased risk of opportunistic infections ⁶. Thus, there is an urgent need for therapeutic strategies for selective targeting of activated autoreactive T cells. Efforts to tolerize antigen-specific naive T cells have been somewhat successful in mice for example using oral autoantigen administration in diabetes and in EAE but their translation from bench to bedside has been disappointing ^{7,8 9}.

Heme oxygenase (HO) catalyzes the degradation of free heme in carbon monoxide (CO), iron, and biliverdin. HO-1 is the only HO isoform that is inducible by inflammatory stimuli or chemical inducers. HO-1-inducers have been approved for the treatment of acute porphyrias in humans ¹⁰. HO-1 induction or genetic overexpression has potent anti-inflammatory effects in rodent models (as reviewed by Blancou et al. ¹¹).The precise mechanisms by which HO-1 acts have not yet been fully elucidated, but several studies have suggested that these mechanisms are at least partially dependent on HO-1⁺ antigen-presenting cells (APCs) ^{12,13}.

We hypothesized that HO-1-mediated protection may exert an antigen-specific action,

possibly *via* antigen presenting cells, if both HO-1 and antigens are present at the same time at sites of T cell priming (in a skin-draining lymph node for example). We addressed the capacity of intradermal injection of HO-1 inducer to tolerize pathogenic CD8⁺ and CD4⁺ T-cells in a transgenic mouse model of induced T1D and EAE respectively. Following CoPP and antigen administration, we have identified an antigen-bearing HO-1⁺ monocyte-derived DC population that appears in the draining lymph node and that tolerizes pathogenic T-cells by inhibiting their infiltration into the targeted organ. Finally, we investigated the impact of intradermal injection of a clinically approved HO-1 inducer in non-human primate to abolish delayed type 1 hypersensitivity (DTH).

RESULTS

Genetic manipulation of HO-1 expression in APCs prevents T1D

Since DCs play a critical role in T1D onset¹⁴ by presenting β -islets autoantigens to autoreactive pathogenic T-cells, and because HO-1 exerts its immunosuppressive effect mainly via APCs^{12,13}, we investigated whether HO-1 expression was impaired in DCs from NOD mice. Indeed, we found that compared to their non-diabetic counterparts (NOR mice)¹⁵, female NOD mice exhibited a lower percentage of HO-1-expressing cells among CD11c⁺ cells (Fig. 1a, b).

To determine whether HO-1 expression in APCs could impact diabetes, we used pIi-TTA mice, a strain in which the Tet ON system is under the control of the MHC-II invariant chain (E α -Ii) promoter¹⁶. pIi-TTA mice were crossed with TetO-HO-1 transgenic NOD mice, in which the HO gene is under the control of the hybrid CMV-Tet operator. In the resultant TetO-HO-1⁺ pIi-TTA⁺ double-transgenic mice, doxycycline administration induced dose-dependent increases in HO-1 expression in both bone marrow derived dendritic cells (BMDCs) (Supplementary Fig. 1) and splenic DCs (Fig. 2a,b). In female NOD mice, doxycycline-induced HO-1 expression was mainly observed in DCs (data not shown), and restored HO-1 levels to those of NOR mice. When doxycycline was provided in drinking water starting from four weeks of age, the doxycycline-treated TetO-HO-1⁺ pIi-TTA⁺ female mice exhibited lower T1D incidence compared to treated single transgenic or untreated littermates (Fig. 2c). This phenomenon was dose-dependent (Supplementary Fig. 2). Among doxycycline-treated animals, TetO-HO-1⁺ pIi-TTA⁺ mice exhibited reduced leukocyte infiltration compared to TetO-HO-1⁺ pIi-TTA⁻ mice (Fig. 2d). Finally, we investigated the ability of HO-1 induction in MHC-II⁺ APCs to reduce glycemia in already diabetic mice. Out of 8 TetO-HO-1⁺ pIi-TTA⁺ diabetic mice treated with doxycycline, three were rendered normoglycemic whereas none were cured in the TetO-HO-1⁺ pIi-TTA⁻ group (Fig. 2e).

Altogether, our data demonstrated that HO-1 overexpression in MHC-II⁺ APCs reduced T1D incidence in NOD mice in preventive settings and may cure diabetic NOD mice in curative settings.

HO-1 inducer and cognate antigen co-administration protect against autoimmune diabetes by inhibiting CTL accumulation in the pancreas.

Given that HO-1 expression in APCs leads to the inhibition of T1D, we hypothesized that HO-1-mediated protection may exert an antigen-specific action if both HO-1 expression and antigens presentation occurs at the same time in the same APC. By using intradermal (i.d.) injection CoPP, we showed that HO-1 expression is locally induced (5.8 fold \pm 1.8) in MHC-II⁺ cells of the draining lymph node but not in non-draining lymph node (data not shown) or spleen (Supplementary Fig. 3a,b). When fluorescent OVA (OVA-488) is i.d. co-injected with CoPP, MHCII⁺ HO-1⁺ endocytosed surrounding antigens (figure 3a).

To investigate whether autoreactive cytotoxic T Cells (CTL) could be tolerized by i.d. co-administration of HO-1 inducers and autoantigens, we took advantage of RIP-OVA^{high} transgenic mice in which OVA is selectively expressed in pancreatic β cells¹⁷. When adoptively transferred with activated OVA-specific CTLs, RIP-OVA^{high} transgenic mice rapidly developed T1D, as previously reported¹⁷. However, i.d. co-injection of RIP-OVA^{high} transgenic mice with OVA and low-dose CoPP one day before CTL transfer reduced diabetes (Fig. 3b). Such protection was not observed in mice injected with either OVA or CoPP alone or with CoPP and irrelevant antigen as human serum albumin (HSA), suggesting that CoPP mediated this protection by interfering with antigen-specific immune responses. Administration of the HO-1 enzymatic inhibitor MnPP also abolished protection, further implying that this protection relied on increased HO-1 enzymatic activity. We found that the induction of tolerance was associated with decreased insulinitis (Fig. 3c) in animals that

receive HO-1 inducer and autoantigen. Interestingly, this protection was only achieved when CoPP and OVA were injected i.d. but not intravenously (Fig. 3d).

Altogether, these results demonstrate that ongoing autoreactive CD8⁺-cells response is tolerized *in vivo* upon i.d. injection of their cognate antigen together with CoPP.

HO-1⁺ MoDCs are recruited following HO-1 inducers treatment and are responsible for pathogenic CD8⁺ T-cells tolerization

To address further the mechanism by which HO-1 mediate ongoing T-cells response tolerization, we characterize the cell population that mediates tolerization. Since co-injection of CoPP and OVA dramatically increased the number of HO-1⁺MHC-II⁺ cells in draining LNs (Supplementary Fig. 3a,b), we further characterized these cells for surface molecule expression and for their ability to tolerize preactivated T-cells. Twenty-four hours after i.d. injection of CoPP and antigen, the vast majority of MHC-II⁺HO-1⁺ cells recruited in the draining LNs exhibited a CD11b⁺CD11c^{low}F4/80⁺CD64⁺Ly6C⁺FcεRI⁺ surface phenotype, which is a distinctive feature of Monocyte-derived DCs (MoDCs)¹⁸ (Fig. 4a). Following CoPP immunization, these cells were massively recruited in the draining LNs in contrast to control animals (Fig. 4b,c). Previous studies have demonstrated that CCR2 deficient mice exhibited markedly reduced MoDC recruitment from the blood¹⁹ and, accordingly, the number of HO-1⁺ MoDCs in the LNs of CoPP immunized mice was dramatically reduced in CCR2-deficient mice (1.5×10^3 cells/LN) compared to WT animals (2.15×10^5 cells/LN) (Fig. 4d), confirming the monocytic origin of the HO-1⁺ APCs in CoPP immunized mice. Concerning the origin of MoDC, they can be recruited in the draining LN from circulating monocytes present either in the blood or in the dermis²⁰. Administration of the D₂ prostaglandin receptor agonist BW245c as a dermal migration inhibitor did not affect MoDC recruitment, suggesting that MoDCs were recruited directly from the blood (Supplementary

Fig. 4). This result was confirmed by the extent of MoDC recruitment after excision of the CoPP-injected dermal site one hour after CoPP injection, which was incompatible with a skin origin of the MoDCs (Supplementary Fig. 4). Supporting the hypothesis of tolerogenic moDCs, we found that moDC from the draining LN of mice injected with CoPP secreted lower IL-12 levels and higher IL-10 levels in response to LPS (Fig. 4e), and expressed lower surface levels of co-stimulatory molecules (Fig. 4e,f,g) compared to control which is in accordance with a tolerogenic profile.

To further investigate which HO-1⁺ were responsible for T-cell tolerization in CoPP-injected mice, MHC-II⁺ cells and MoDC were purified from the draining LN of mice immunized with CoPP and OVA, and incubated for four hours with pre-activated OVA-specific CTLs. Next, these cells were adoptively transferred into RIP-OVA^{high} mice, which were then monitored for T1D. CTLs that were incubated with MHC-II⁺ cells or MoDCs from CoPP/OVA-immunized animals exhibited a decreased ability to induce T1D compared to control (Fig. 4h) suggesting that HO-1⁺ MoDCs were indeed responsible for the tolerization of OVA-specific CTLs observed in mice co-injected with CoPP and OVA.

Taken as a whole, these data show that MoDCs with tolerogenic profile are recruited following HO-1 inducer i.d. injection and that these cells are responsible for protection against T1D induced by CTLs.

Following HO-1-inducer injection, pathogenic CD8⁺ T-cells show altered migration-related functions

We next investigated the mechanism of tolerance of autoreactive CD8⁺-cells by HO-1 inducer. To this aim we compared the cytotoxic activities and distributions of OVA-specific CTLs in mice immunized with CoPP/OVA or OVA alone. CTL activities were measured using an *in vivo* cytolytic assay, and were similar in both groups at day 2 and 6 post-injection

(Fig. 5a). Furthermore, both groups exhibited similar numbers of OVA-specific CTLs in the spleen, and in draining and pancreatic LNs at two days (Fig. 5b) and six days (data not shown) after injection. We next assessed the migration capabilities of autoreactive CD8⁺ T-cells using light-sheet-based fluorescent microscopy on pancreas short-term after CFSE-labeled CTL transfer (Fig. 5c). we show that the migration of the CTL injected in CoPPOVA treated mice to the targeted organe is inhibited.

To further investigate the mechanism responsible for the impaired capability of pathogenic T-cells to migrate to the targeted organ, we performed a whole-transcriptomic analysis on CTLs that have been or not tolerized by HO-1 inducer i.d. injection. Only 33 genes were significantly differentially expressed, among which 27 were upregulated and 6 were downregulated in CoPP-injected mice compared to untreated animals (Supplementary Table S1). Among these genes, the cytoskeletal β -actin is the most repressed gene in CoPP condition (Fig. 5d) and is directly linked to cell motility and migration ²¹. Intracellular staining confirmed a reduced β -actin expression in CTLs from CoPP-treated mice compared to those from untreated animals (Fig. 5e,f). To explore the impact of these differences on CTL functions including migration capabilities, we performed *in vitro* experiments measuring CTL velocity and ability to respond to chemokine gradients in a transwell migration assay. Compared to non-tolerized control cells, tolerized CTLs exhibited a reduced cell velocity (Fig. 5g) and a decreased ability to migrate along chemokine gradients (Fig. 5h).

As conclusion, CoPP-tolerized pathogenic autoreactive CD8⁺ T-cells show impairment in migration-related function as expression of cytoskeleton protein, cell velocity or response to chemokine gradients.

Human PBMCs treated with HO-1 inducer reduce T-cell velocity of CD8⁺ T-cells clones

We next investigated whether human monocytes can express HO-1 and have tolerogenic

functions. With this aim, we incubated PBMCs from healthy human volunteers with clinically relevant HO-1 inducer (hemin). Four hours later, these cells were analyzed for HO-1 expression. Hemin induced highest HO-1 expression in human MHC-II⁺CD11c⁺CD14⁺ cells (Fig. 6a,b). Accordingly, cells from the human monocytic cell line THP-1 dose-dependently expressed HO-1 upon incubation with CoPP (Fig. 6c,d) or hemin (supplementary Fig. 5a,b). Compared to untreated THP-1 cells, HO-1⁺ THP-1 cells secreted reduced levels of the inflammatory cytokine IL-1 β (Fig. 6e) and expressed lower surface levels of the co-stimulation markers CD40 and CD86 (Fig. 6f,g). Furthermore, HO-1⁺ THP-1 cells reduced human CTL velocity (Fig. 6h)

Altogether, these results showed that clinically approved HO-1 inducers preferentially target monocytic cells in human, and suggested that these cells could tolerize CTLs in humans.

HO-1 inducer and cognate antigen co-administration inhibit CD4⁺ T cell accumulation in the CNS.

Given that HO-1 induction have shown some anti-inflammatory properties for CD4⁺ T-cells in the EAE model (14), we hypothesized that HO-1-mediated protection may exert an antigen-specific action if both HO-1 expression and antigens presentation occurs at the same time in the same APC. When using a low dose of CoPP (0.2 mg/mouse), we found that i.d. injection of CoPP alone is not sufficient to tolerize against EAE in preventive (administration CoPP treatment on day 0, 3 and 6 after MOG immunization) or curative (CoPP administration 3 times, 3 days apart, after the first clinical signs of EAE appeared) settings (Fig. 7a). However when a low dose of CoPP is co-administred intradermally with cognate antigen (MOG₃₅₋₅₅ class II peptide) tolerization of myelin-specific CD4⁺ T-cells occurs preventively or curatively (Fig. 7a). Such protection was not observed in mice injected with MOG₃₅₋₅₅

alone or with CoPP and irrelevant peptide, demonstrating that CoPP-induced protection is antigen-specific (Fig. 7a). Likewise CoPP-induced CTLs tolerisation, MOG-specific CD4⁺ T-cell have the same proliferation capacity (fig.7b, c) in CoPP injected mice and untreated mice. This protection was associated with an inhibition of infiltration in the CNS of CoPP MOG treated mice (Fig. 7d, e). We observed a significant decrease of the absolute number of MOG-specific CD4⁺ T-cells in the CNS in CoPP MOG-treated mice compared to control (Fig.7f, g) for preventive settings. Interestingly, in peripheral compartment (spleen and lymph node) the number of MOG specific T cell is unchanged suggesting an impairment of MOG-specific CD4⁺ T-cells migration in the CNS.

Altogether, these results demonstrate that ongoing autoreactive CD4⁺ Tcells response is tolerized *in vivo* upon i.d. injection of their cognate autoantigen and CoPP.

HO-1-induced tolerance extinguishes delayed type hypersensitivity in baboons.

To investigate whether HO-1 inducers could induce HO-1⁺ MoDCs in primates, we injected baboons intradermally with clinical-grade hemin (Normosang®), an HO-1-inducer that has been approved for the treatment of acute porphyrias in humans¹⁰. Hemin injection dose-dependently increased the frequency of HO-1⁺ cells in draining LN but not in the contralateral LNs (Fig. 8a,c). These HO-1⁺ cells expressed MHC-II, CD11c, and CD14 (Fig. 8b,c) by contrast to MHC-II⁺, CD11c⁺, and CD14 negative cells (Fig. 8d), further suggesting that they were MoDCs.

As a first step to investigate whether HO-1 inducers could be used to induce antigen-specific tolerance in primates, we used a delayed type hypersensitivity (DTH) model in baboons. Animals were immunized with BCG vaccine and challenged three consecutive times over five months period with tuberculin intradermal reaction (IDR) (Fig. 8e). These animals showed a measurable and reproducible erythema (minimal size of 4 mm) lasting from 3 to 7 days after

injection of tuberculin purified protein derivative (PPD) (Fig. 8f). Six month after the last IDR, animals were tolerized by i.d. injection of Normosang and tuberculin. Four days, one, two and three month after tolerization, IDR was assessed. A strong reduction of IDR was observed following tolerization protocol with a progressive reappearance at three month (Fig. 8f).

As conclusion, i.d. administration of clinical hemin and tuberculin in BCG vaccinated baboons resulted in suppression of T cell memory response against tuberculin for at least two months.

Discussion :

Parenteral or intranasal or oral route administration of self-antigens alone have been used to induce specific tolerance to β -cell antigens (28). These treatments have occasionally been reported to induce a delay in autoimmune disease (29) but overall the results have been disappointing notably in human. However, the results of such studies have suggested that the antigen and adjuvant selection may be paramount for ensuring the success of this strategy.

Protection from autoimmune diseases has been shown following HO-1 pharmaceutical inducers or heme degradation products (e.g., CO) systemic administration (30). However, this effect is not antigen-specific as autoantigen co-administration is not need to achieve protection. Based these results and on the results obtained in NOD mice (figure 1 and 2), we reasoned that localized HO-1 induction along with antigen administration could be used as a tolerogenic strategy for autoimmune diseases treatment. Our group (31) and others (30) have previously demonstrated that HO-1 induction confers tolerogenic properties to classical DCs and inhibits pathogenicity of naive T-cells. One of the most striking results in the present study was that MoDCs induced to express HO-1 could also inhibit activated CTLs or CD4⁺ T cells *in vivo* (Fig 3 and 7). To our knowledge, this is the first demonstration that an ongoing CTL response can be inhibited in an antigen-specific manner using protein antigen without adoptive cell transfert or high doses of antigens administration. The identification of MoDCs as the major player of ongoing CTL tolerisation (Fig. 4) is also a breakthrough since this subpopulation has only been described so far to be recruited during inflammation and to show immunogenic properties (20). Compared to control HO-1⁻ MoDCs, we found that HO-1⁺ MoDCs secreted lower IL-12 levels and higher IL-10 levels (Fig. 4e), and expressed lower levels of costimulatory molecules (Fig. 4f,g) compatible with a tolerogenic profile. Interestingly, in the natural process of apoptotic erythroid cells engulfment (a process called hemophagocytic) by MoDC lead to both increase HO-1 expression and IL-10 secretion that

moderate anti-viral CTL activity (32). We can hypothesized that natural hemophagocytosis is contributing to peripheral self-tolerance by HO-1⁺MoDC self-antigens presentation to T-cells in non-inflammatory conditions.

Regarding the mechanism of CTLs tolerisation, we found that their proliferation or lytic activity was not impaired following exposure to HO-1⁺ MoDCs *in vivo* (Fig 5 a,b). In striking contrast, tolerized CTLs were impaired in their ability to migrate to non-lymphoid tissues, as demonstrated by the lack of migration to RIP-OVA^{high} mice pancreatic islets short-term after transfert (Fig 5c). This defect was also associated with both a decreased velocity and lower ability to respond to a chemokine gradient *in vitro* (Fig. 5e,f). Default in migration properties are in line with the decreased integrin expression in lymphocytes upon exposure to carbon monoxide produced by HO-1 in mouse (31), providing a most probable mechanistic explanation for the phenotype of tolerized CTLs. The precise molecular mechanisms responsible for tolerization remains unknown, but several clues are provided in the present results.

Proliferation of EAE pathogenic CD4⁺ T-cells can be inhibited by intra peritoneal administration of massive dose of HO-1 inducer (30). By contrast administration of lower dose of HO-1 inducer with antigen rather leads to inhibition of pathogenic CD4⁺ T-cells migration to the tissue (Fig. 4d-g). Inhibition of pathogenic T lymphocytes migration to the CNS has been show to inhibit encephalomyelitis as exemplified by the use of Natalizumab as a very effective treatment for MS leading to significantly reduces the number and severity of clinical relapses (33).

Representing an improvement over the results of previous strategies using HO-1 or its derivatives as tolerogenic agents to cure autoimmune diseases (30), the tolerance observed following intradermal injection of HO-1 inducer was clinically relevant, antigen-specific and effective against ongoing cytotoxic immune response. As observed in mice, we found that the

intradermal injection of HO-1 inducers in non-human primates resulted in the appearance of HO-1⁺ MoDCs in draining LNs. Most importantly, cells from a human monocyte cell line that were induced to express HO-1 upon incubation with HO-1 inducers show reduced velocity of human CTL clone, further suggesting that the same tolerizing mechanisms occur across species. In addition, the protection is achieved using protein as antigen, which may represent an asset for clinical use as it tolerizes against many antigens as compared to peptide antigen. We believe that this is an important finding because HO-1 inducers such as Normosang® and Panhematin® have been already approved for the treatment of acute porphyria in humans (12), therefore paving the way for the use of this molecule to prevent the development of T1D and autoimmune diseases in humans.

MATERIALS AND METHODS

Methods and any associated references are available in the online version of the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

This project was funded by the Fondation Progreffe (to IA), JDRF (to PB, grant number 5-2010-640), Institut Hospitalo Universitaire-CESTI (to IA), and the IMBIO network funded by the Région Pays de la Loire (to PB). We thank Steven Nedellec and Philippe Hulin for their excellent technical assistance. E.P. is supported by ANR-10-IDEX-0001-02 PSL and ANR-11-LABX-0043. We also thank Nicolas Glaichenhaus for critical reading of the manuscript.

Conflict of interest

The authors have no conflicting financial interests.

REFERENCES

1. Bluestone, J.A., Herold, K. & Eisenbarth, G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature* **464**, 1293-300 (2010).
2. Herold, K.C. et al. Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* **346**, 1692-8 (2002).
3. Pescovitz, M.D. et al. Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function. *N Engl J Med* **361**, 2143-52 (2009).
4. Orban, T. et al. Reduction in CD4 central memory T-cell subset in costimulation modulator abatacept-treated patients with recent-onset type 1 diabetes is associated with slower C-peptide decline. *Diabetes* **63**, 3449-57.
5. Orban, T. et al. Co-stimulation modulation with abatacept in patients with recent-onset type 1 diabetes: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* **378**, 412-9.
6. Keymeulen, B. et al. Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med* **352**, 2598-608 (2005).
7. Chaillous, L. et al. Oral insulin administration and residual beta-cell function in recent-onset type 1 diabetes: a multicentre randomised controlled trial. Diabete Insuline Orale group. *Lancet* **356**, 545-9 (2000).
8. Weiner, H.L. et al. Double-blind pilot trial of oral tolerization with myelin antigens in multiple sclerosis. *Science* **259**, 1321-4 (1993).
9. Miller, S.D., Turley, D.M. & Podojil, J.R. Antigen-specific tolerance strategies for the prevention and treatment of autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* **7**, 665-77 (2007).
10. Anderson, K.E. et al. Recommendations for the diagnosis and treatment of the acute porphyrias. *Ann Intern Med* **142**, 439-50 (2005).
11. Blancou, P. et al. Immunoregulatory properties of heme oxygenase-1. *Methods Mol Biol* **677**, 247-68 (2011).
12. Chauveau, C. et al. Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood* **106**, 1694-702 (2005).
13. Remy, S. et al. Carbon monoxide inhibits TLR-induced dendritic cell immunogenicity. *J Immunol* **182**, 1877-84 (2009).
14. Jansen, A. et al. Immunohistochemical characterization of monocytes-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of the insulinitis and beta-cell destruction in NOD mice. *Diabetes* **43**, 667-75 (1994).
15. Prochazka, M., Serreze, D.V., Frankel, W.N. & Leiter, E.H. NOR/Lt mice: MHC-matched diabetes-resistant control strain for NOD mice. *Diabetes* **41**, 98-106 (1992).
16. Witherden, D. et al. Tetracycline-controllable selection of CD4(+) T cells: half-life and survival signals in the absence of major histocompatibility complex class II molecules. *J Exp Med* **191**, 355-64 (2000).
17. Parish, I.A. et al. Tissue destruction caused by cytotoxic T lymphocytes induces deletional tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 3901-6 (2009).
18. Segura, E. & Amigorena, S. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol* **34**, 440-5 (2013).
19. Tsou, C.L. et al. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest* **117**, 902-9 (2007).
20. Plantinga, M. et al. Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity* **38**, 322-35 (2013).
21. Bunnell, T.M., Burbach, B.J., Shimizu, Y. & Ervasti, J.M. beta-Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool. *Mol Biol Cell* **22**, 4047-58

-
- (2011).
22. Vizler, C. et al. Relative diabetogenic properties of islet-specific Tc1 and Tc2 cells in immunocompetent hosts. *J Immunol* **165**, 6314-21 (2000).
 23. Hogquist, K.A. et al. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* **76**, 17-27 (1994).
 24. Auwerx, J. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* **47**, 22-31 (1991).
 25. Roulois, D. et al. Recognition of pleural mesothelioma by mucin-1(950-958)/human leukocyte antigen A*0201-specific CD8⁺ T-cells. *Eur Respir J* **38**, 1117-26 (2011).
 26. Morgan, D.J. et al. CD8(+) T cell-mediated spontaneous diabetes in neonatal mice. *J Immunol* **157**, 978-83 (1996).
 27. Dodt, H.U. et al. Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nat Methods* **4**, 331-6 (2007).
 28. Erturk, A. et al. Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat Protoc* **7**, 1983-95 (2012).
 29. GAD Treatment and Insulin Secretion in Recent-Onset Type 1 Diabetes — NEJM.” [Online]. Available: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa0804328#t=article>.
 30. A. A. Chora, P. Fontoura, A. Cunha, T. F. Pais, S. Cardoso, P. P. Ho, L. Y. Lee, R. A. Sobel, L. Steinman, and M. P. Soares, “Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress autoimmune neuroinflammation.,” *J. Clin. Invest.*, vol. 117, no. 2, pp. 438–47, Feb. 2007.
 31. T. Simon, S. Pogu, V. Tardif, K. Rigaud, S. Rémy, E. Piaggio, J.-M. Bach, I. Anegon, and P. Blancou, “Carbon monoxide-treated dendritic cells decrease β 1-integrin induction on CD8⁺ T cells and protect from type 1 diabetes.,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 43, no. 1, pp. 209–18, Jan. 2013.
 32. H. Ohyagi, N. Onai, T. Sato, S. Yotsumoto, J. Liu, H. Akiba, H. Yagita, K. Atarashi, K. Honda, A. Roers, W. Müller, K. Kurabayashi, M. Hosoi-Amaike, N. Takahashi, M. Hirokawa, K. Matsushima, K. Sawada, and T. Ohteki, “Monocyte-Derived Dendritic Cells Perform Hemophagocytosis to Fine-Tune Excessive Immune Responses,” *Immunity*, vol. 39, no. 3, pp. 584–598, Sep. 2013.
 33. C. H. Polman, P. W. O’Connor, E. Havrdova, M. Hutchinson, L. Kappos, D. H. Miller, J. T. Phillips, F. D. Lublin, G. Giovannoni, A. Wajgt, M. Toal, F. Lynn, M. A. Panzara, and A. W. Sandrock, “A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis.,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 354, no. 9, pp. 899–910, Mar. 2006.

Figure 1

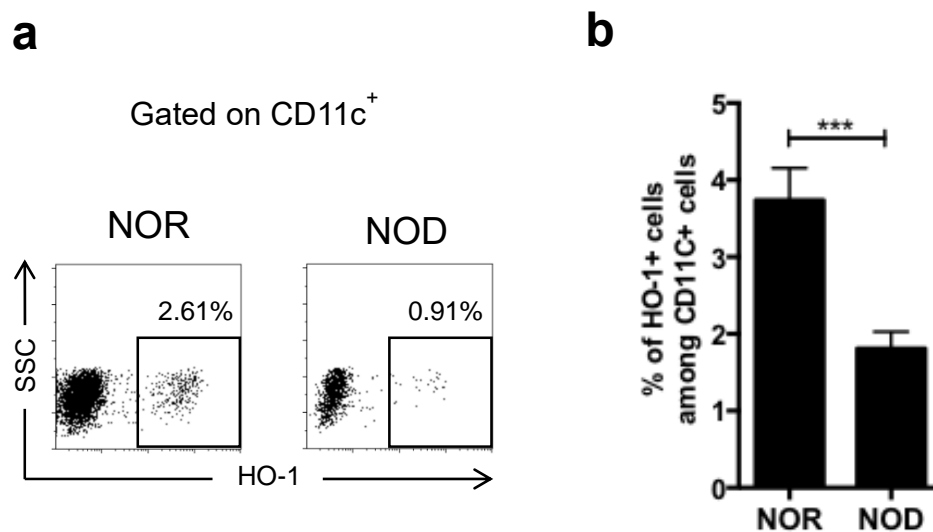
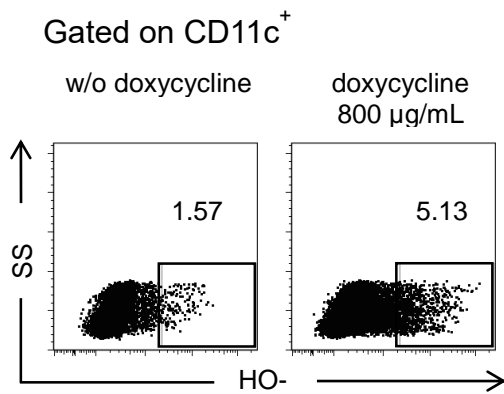


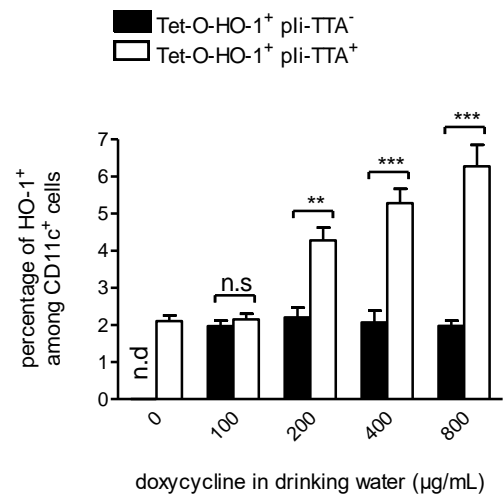
Figure 1. HO-1 expression was impaired in DCs from NOD mice

(a, b) In female NOD and NOR mice, HO-1 expression in splenic DCs was evaluated by FACS after gating on CD11c⁺ cells. Data are presented as representative dot plots (a), and as the mean frequencies \pm s.e.m. ($n = 7-8$ mice/group) (b). *** $P < 0.001$.

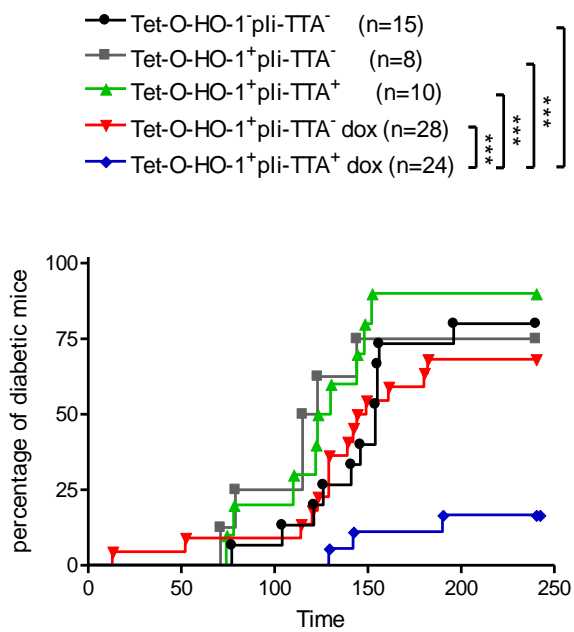
a Figure 2



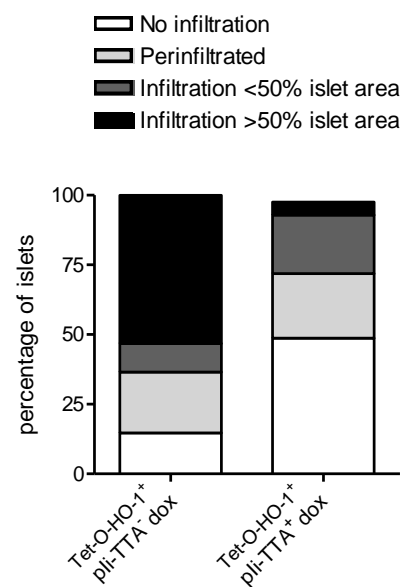
b



c



d



e

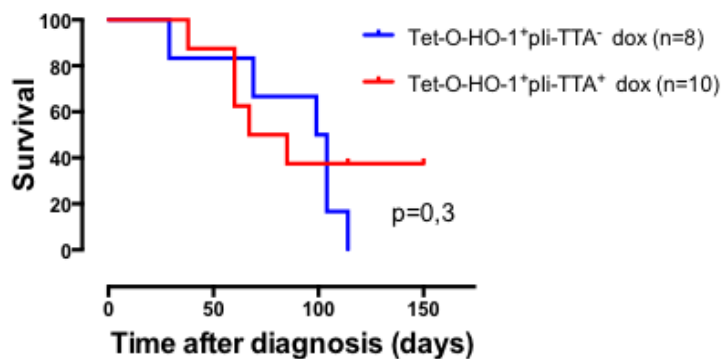
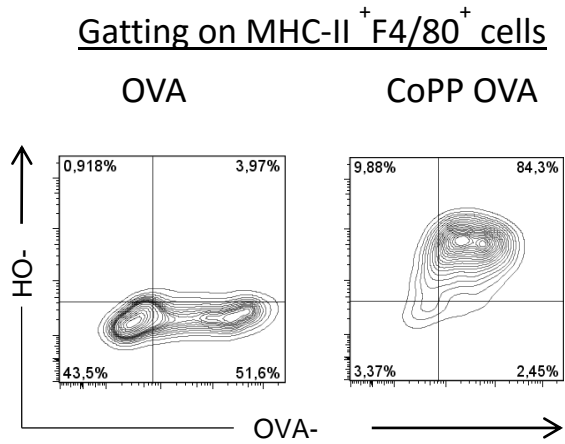


Figure 2. HO-1 induction in APCs decreases diabetes incidence in NOD mice.

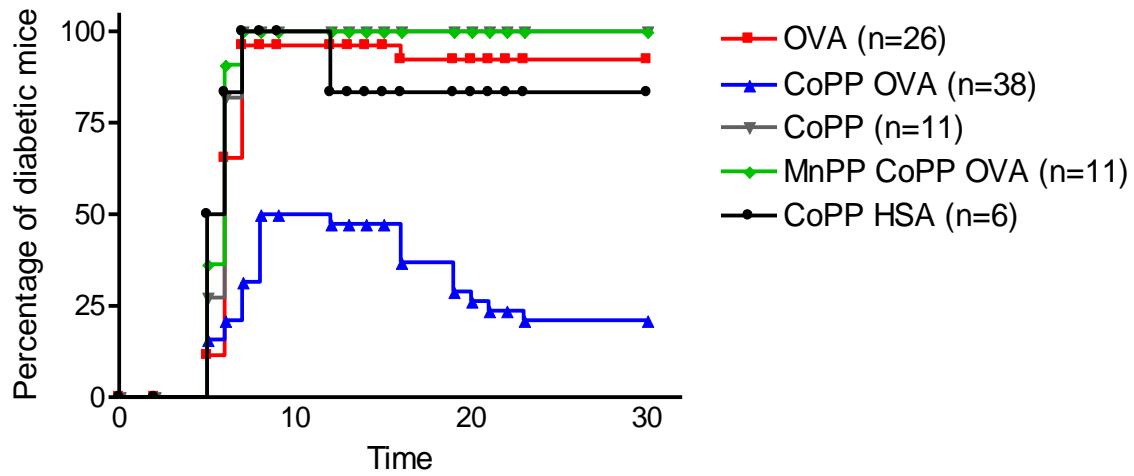
(a-b) In double Tet-O-HO-1/pIi-TTA female transgenic mice, doxycycline (DOX) addition to drinking water induced genetic HO-1 expression. Following three days of escalating doxycycline doses, splenic CD11c⁺ cells from single (Tet-O-HO-1) and double (Tet-O-HO-1/pIi-TTA) transgenic mice were subjected to intracellular HO-1 staining. Data are presented as representative dot plots (a) and as mean frequencies \pm s.e.m. ($n=3$ mice/group) (b). (c) Starting at one month of age, female transgenic mice were treated with 800 μ g/ml doxycycline in drinking water, and were monitored for diabetes onset. (d) In three-month-old female simple (Tet-O-HO-1) and double (Tet-O-HO-1/pIi-TTA) transgenic mice, insulin immunostaining was used to determine the extent of insulinitis as the percentage of normal, peri-infiltrated, infiltration of <50% of islet area, or infiltration of >50% of islet area ($n = 3$ mice/group). The total numbers of analyzed islets for Tet-O-HO-1 and Tet-O-HO-1/pIi-TTA immunized group are 52 and 47, respectively. (e) In simple (Tet-O-HO-1) and double (Tet-O-HO-1/pIi-TTA) transgenic female mice, DOX treatment was initiated when glycemia was over 170mg/dl but under 250mg/dl. Mice then were monitored for glycemia two to three times a week. n.d. = not determined. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Figure 3

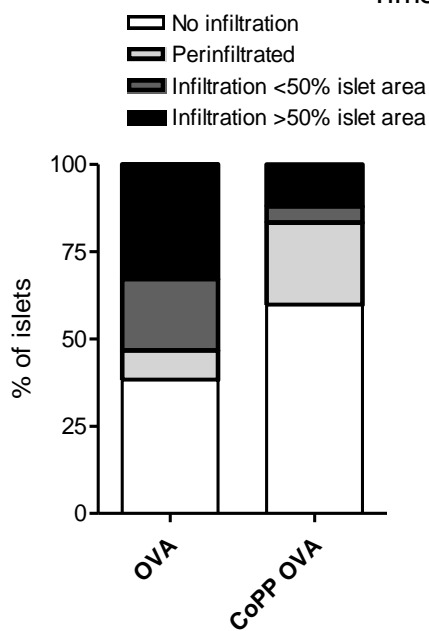
a



b



c



d

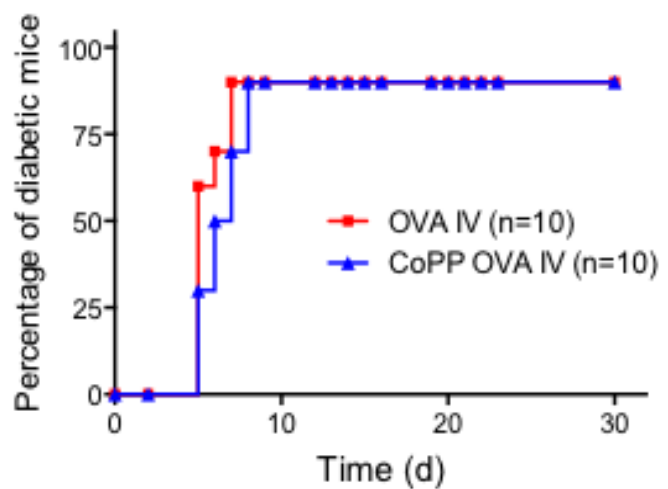


Figure 3. Intradermal injections of CoPP and autoantigen protect against induced diabetes by inhibiting pathogenic T-cells migration to the pancreas.

(a) Proportion of HO-1⁺ MHCII⁺ cells was determined in draining LNs 24 hours after intradermal injection of Alexa Fluor® 488 ovalbumin alone or with CoPP. (b) The day after intradermal treatment with the indicated conditions, Rip-OVA^{high} mice were transferred with 0.5×10^5 autoreactive CTLs. Mice were monitored for diabetes development. HSA: human serum albumin. Data are shown from the indicated numbers of mice pooled from at least three independent experiments. (c) At 6–8 days after CTL transfer, histological analysis was used to determine the extent of insulinitis in two different experiments ($n = 5–6$ mice/group), with >150 islets analyzed for both groups. (d) Same treatment as in (b) except that the route of treatment is intravenous (IV). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Figure 4

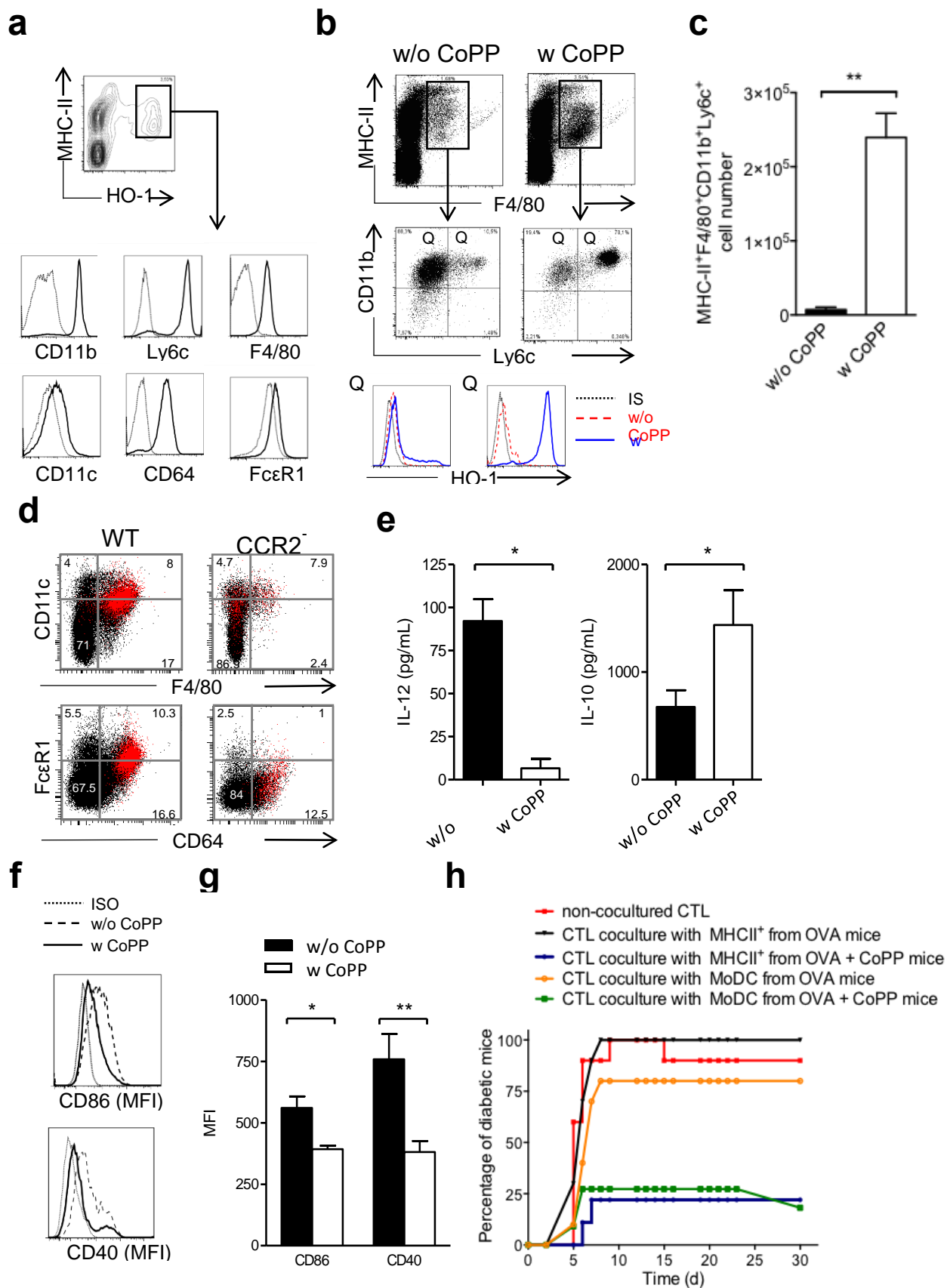


Figure 4. Intradermal injection of CoPP and autoantigen induces HO-1⁺ blood-MoDCs.

(a, b) Representative FACS profiles of phenotypic analysis of HO-1⁺MHC-II⁺ (a) and F4/80⁺MHC-II⁺ (b) cells in the draining lymph node 24 hours following intradermal injection of OVA protein with (w CoPP) or without (w/o CoPP) HO-1 inducer in C57/B6 mice. (c) The number of MHC-II⁺F4/80⁺CD11b⁺Ly6C⁺ cells in the draining LN ($n = 4$ mice/group) is reported. (d) Twenty-four hours following intradermal injection of CoPP in wild type (WT) and CCR2^{-/-} mice, MHC-II⁺ cells in the draining lymph node were analyzed as in (a), red dots are identified as HO-1⁺ cells. (e) Twenty-four hours after intradermal treatment with the indicated conditions, moDC-sorted cells from the draining LNs were stimulated with LPS for 24 h. Supernatants were analyzed for IL-12 and IL-10 contents by ELISA. Data show mean \pm s.e.m. of three experiments. (f-g). MoDC were analyzed for CD40 and CD86 expression in the draining LNs 24 hours after intradermal treatments under the indicated conditions. Data shown as a representative profile (f) and quantitative analysis from three independent experiments ($n \geq 6$ mice/group) (g). (h) Rip-OVA^{high} mice were transferred with 0.5×10^5 autoreactive CTLs co-cultured for 4 hours with F4/80⁺ cells isolated from the draining LN of mice intradermally immunized with OVA with or without CoPP. Mice were monitored for diabetes development. Data shown are from at least 10 mice/group pooled from three independent experiments. Grey line is the staining using control isotype. At least three independent experiments with $n \geq 3$ mice/group were performed. * $P < 0.05$

Figure 5

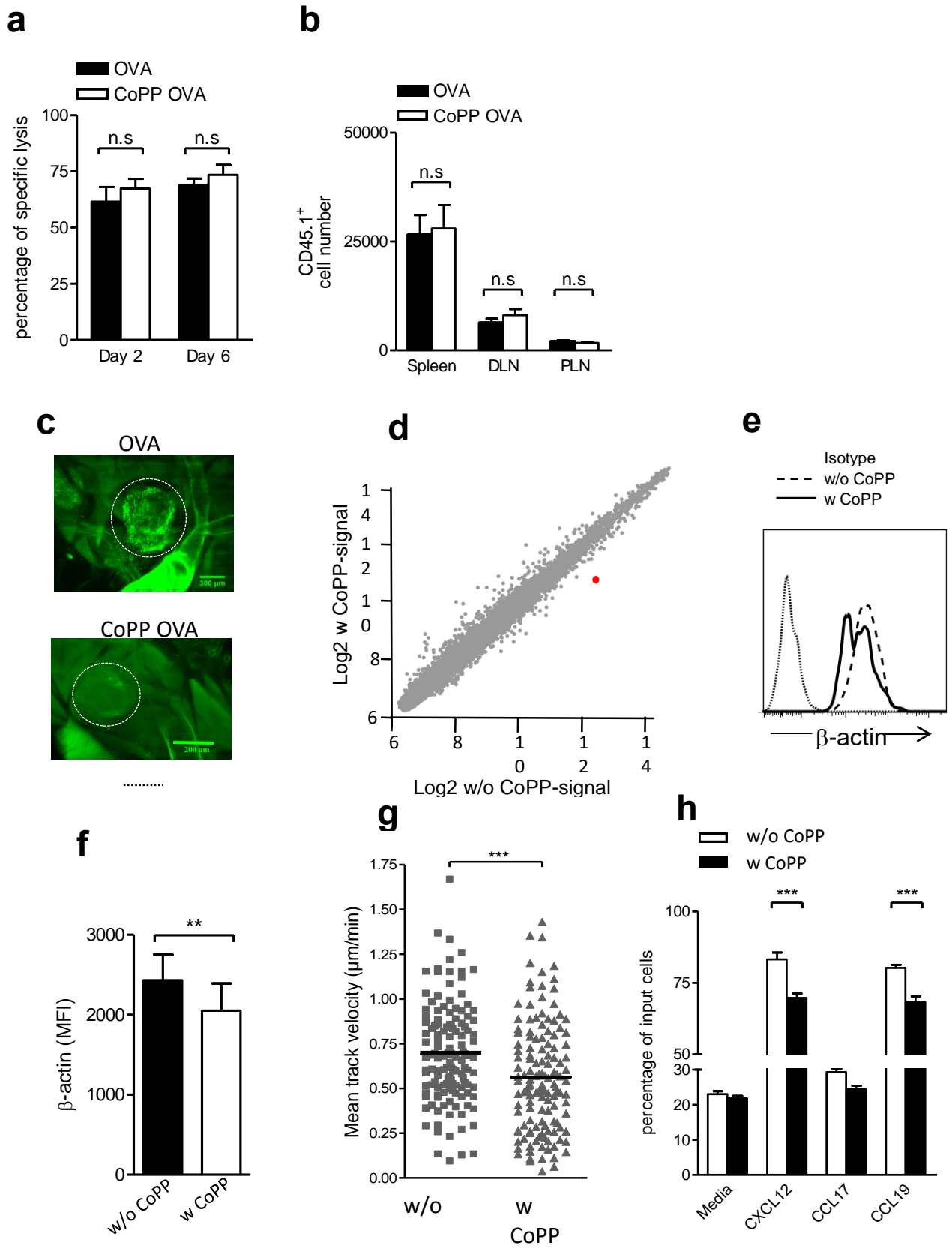


Figure 5. Intradermal injection of CoPP plus autoantigen altered CTLs migration abilities.

(a) On day 2 or 6, *in vivo* CTL assay was performed and specific lysis was determined 12 hours after target cell transfer; data show mean \pm s.e.m. of three experiments ($n \geq 6$ mice/group). (b) Two days after CD45.1⁺ CTLs transfer, absolute numbers of CD8⁺CD45.1⁺ cells were determined in spleen, draining LNs, and PLNs; data show mean \pm s.e.m. of three experiments ($n = 9$ mice/group). (c-d) CD45.1⁺ CTLs were CFSE-labeled before transfer. At 18 hours post-transfer, entire animals were fixed and processed for light-sheet-based fluorescent microscopy analysis. Dotted lines delineate pancreatic islets in one representative infiltrated islets (c). Gene expression signals were compared in CoPP OVA-injected or OVA injected mice on CD45.1-sorted CD8⁺ T cells six days after transfer. Red dot represent β -actin gene. (d) CD45.1⁺ autoreactive CTLs were analyzed for β -actin 8 hours after intravenous injection in OVA- or CoPP-OVA-treated Rip-OVA^{high} mice; data shown by mean \pm s.e.m. of three independent experiments ($n = 6$ mice/group). Data shown as representative FACS profile (e) and mean \pm s.e.m. of three independent experiments ($n = 6$ mice/group) (f). (h-g) Twenty four hours after receiving CoPP-OVA or not OVA, MHC-II⁺ cells isolated from draining LN were cocultured with autoreactive CTLs. CTL velocity measurement on confluent SVECs cells (h) and transwell migration assay with the indicated chemokines (g) were performed one day after the *in vitro* culture. (b-d) Data show mean \pm s.e.m. of three independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Figure 6

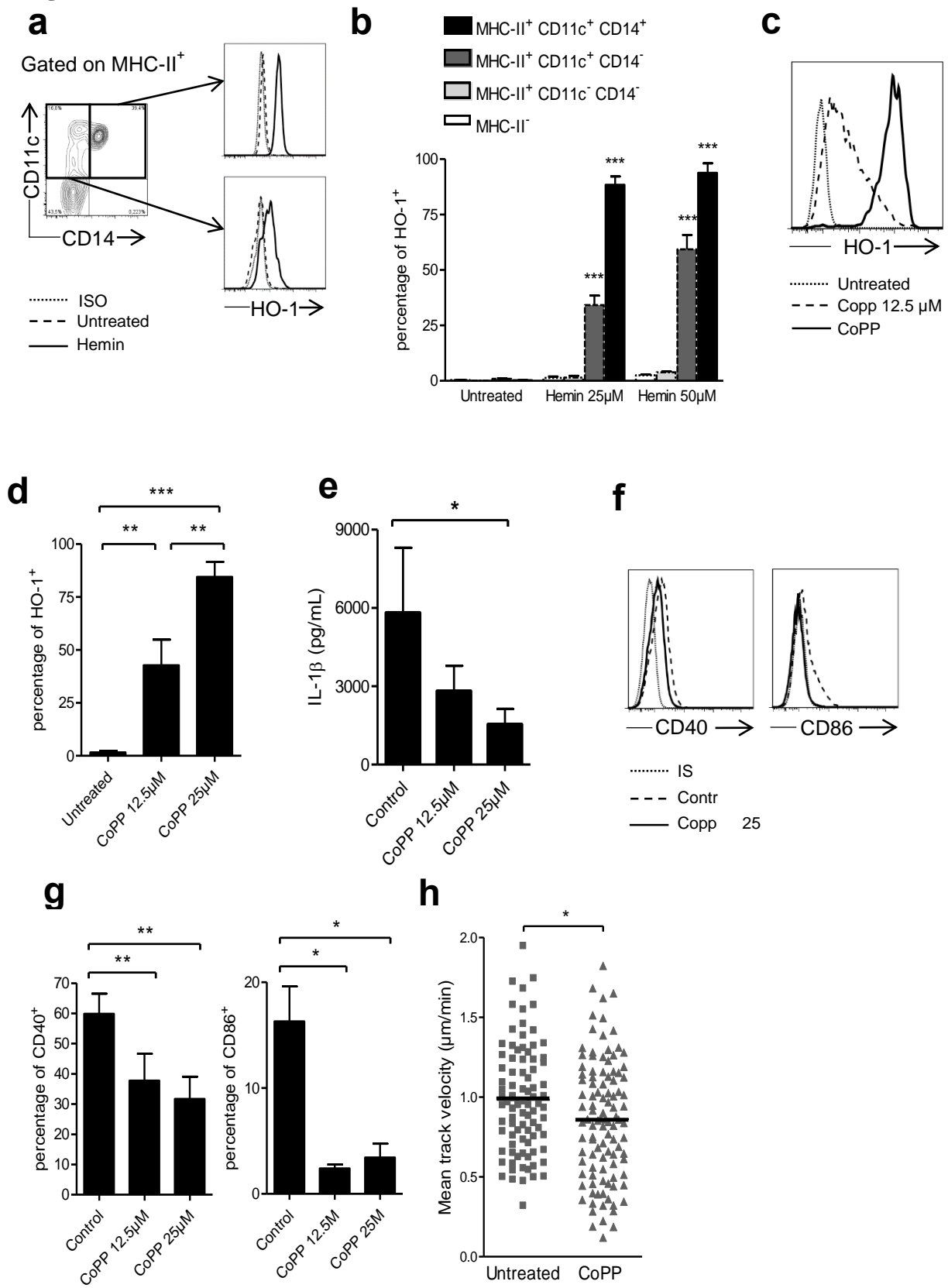


Figure 6. Phenotype of human monocyte following HO-1 inducer treatment. (a,b) Human PBMC were analyzed for HO-1 expression 4 hours after *in vitro* hemin treatment. Data show a FACS profile from one donor (a) and mean frequencies \pm s.e.m. of five donors (b). (c,d) Human monocytic THP-1 cells were analyzed for HO-1 expression 16 hours after *in vitro* CoPP treatment. (e) IL-1 β secretion in LPS activated Human monocytic THP-1 supernatant after CoPP treatment. (f,g) Human monocytic THP-1 cells were analyzed for CD40 and CD86 expression 16 hours after *in vitro* CoPP treatment. (h) MUC1 clones were also analyzed for velocity following 16 hours of co-culture with THP-1 cells untreated or treated with CoPP and pulsed with the relevant peptide. Data shown as representative FACS profiles (a,c and f) and as mean \pm s.e.m. of three independent experiments (b,d and g). * $P < 0.05$.

Figure 7

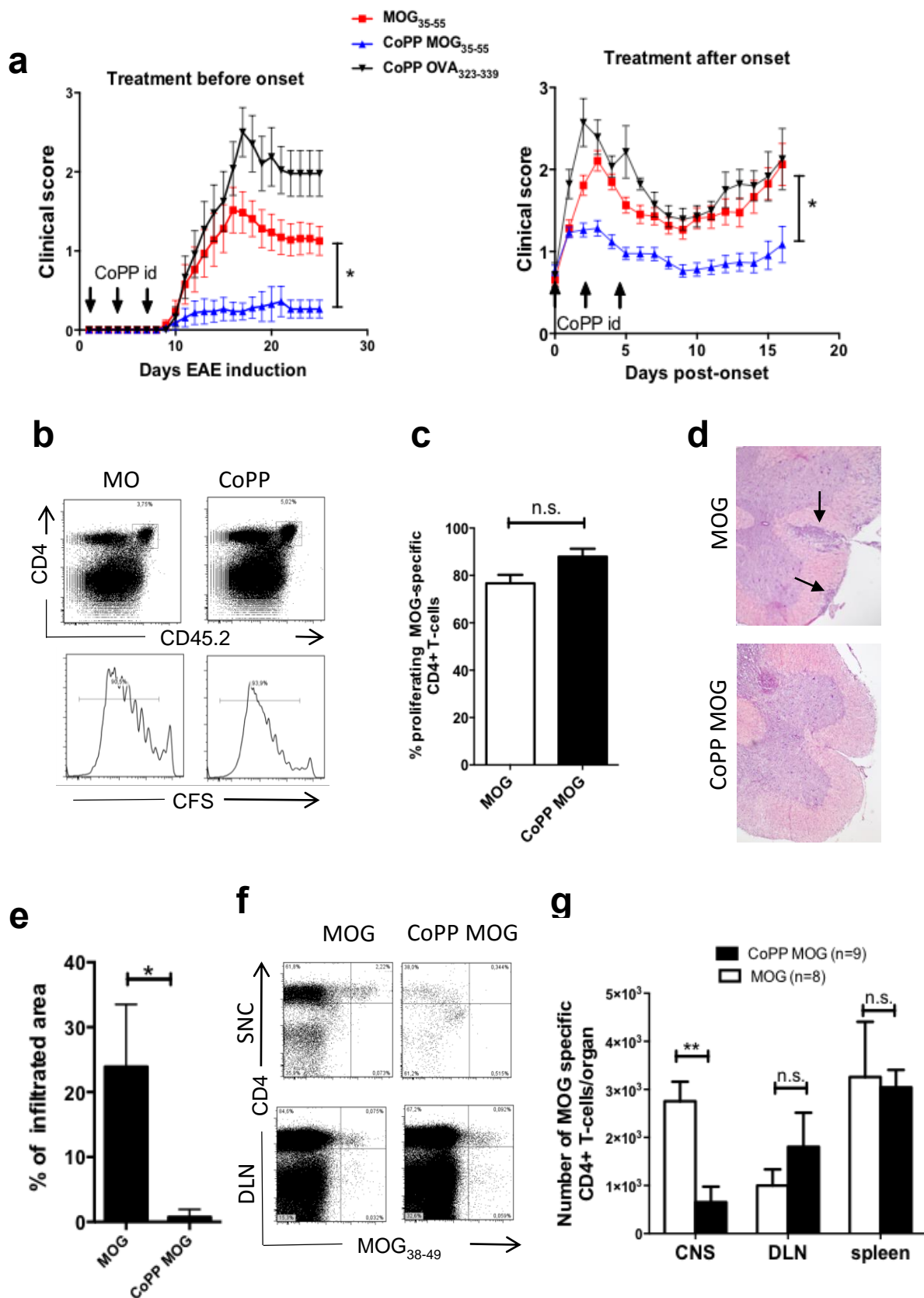


Figure 7. Intradermal injection of CoPP and autoantigen protect against EAE by inhibiting pathogenic T-cells migration to the CNS. (a) Mice were induced for EAE and treated or not either starting at the time of EAE induction (“treatment before onset”) (or starting after the appearance of the first clinical signs (“treatment after onset”) three times three days appart. Clinical scores were measured every day and are shown as mean \pm SEM of more than three independent experiments. (b, c) Representative hematoxylin and eosin spinal cord staining are shown (b) The quantification of the infiltrate was calculated by manual measurement of areas after clipping. Using a matrix each infiltrating cell is detectable like a one black pixel.(c). One representative experiment out of two is presented (n=4 mice/group). (d,e) The impact of CoPP treatment on T cell proliferation (day 0 and 3) was evaluated in C57/B6 CD45.1/1 mice immunized with MOG₃₅₋₅₅ peptide that received 6×10^6 CFSE-loaded 2D2 anti-MOG CD45.2/2 CD4⁺ cells. Data are presented as representative dot plots (d), and as the percentage of proliferating cell \pm s.e.m. ($n = 7-8$ mice/group) (e). (f, g) CD4⁺ T-cells from CNS or DLN were harvested and stained with MOG₃₈₋₄₉-APC tetramer. Data are presented as representative dot plots (f), and as number of cells per organ \pm s.e.m. ($n = 7-8$ mice/group) (g).

Figure 8

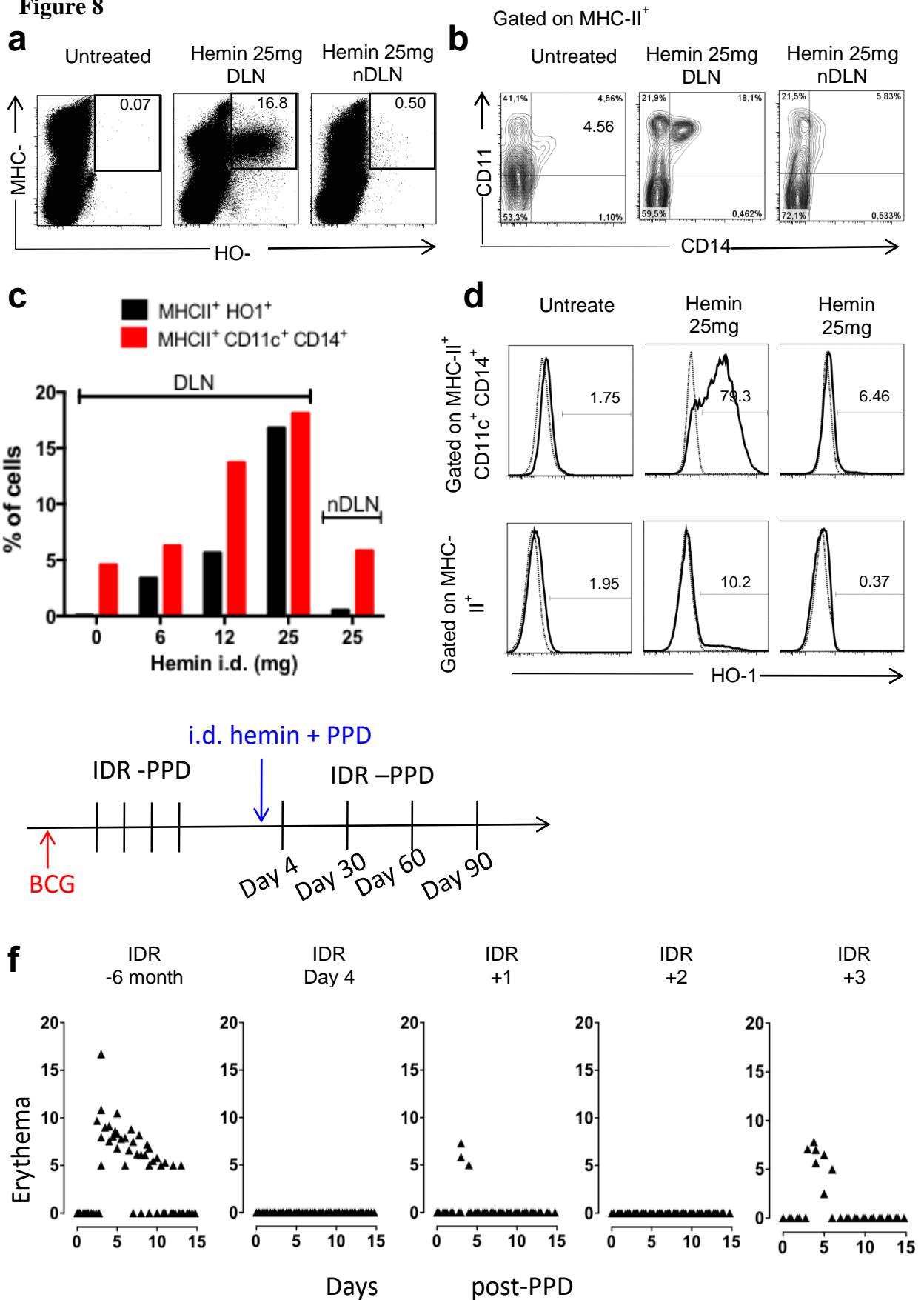


Figure 8. Treatment with clinical hemin in non-human primates induces HO-1 in MHC-II⁺ cells in the draining LN and extinguish DTH reaction.

(a-d) HO-1 induction with Normosang® was evaluated either *in vivo* after intradermal immunization in Baboons. Twenty-four hours after intradermal injection of clinical grade hemin (Normosang®), the proportion of HO-1⁺ (a) or CD14⁺CD11c⁺ (b) in MHC-II⁺ cells was determined by intracellular staining in the DLN and in the non-DLN (nDLN) of treated or non-treated baboons. Data show representative FACS profile (a,b) and frequencies (c) with one baboon/condition. (d) The expression of HO-1 was evaluated in MHC-II⁺CD11c⁺CD14⁺ or CD14⁻ cells. (e) Four baboons were immunized with BCG and challenged with tuberculin for DTH assessment before and after Normosang (hemin) treatment. (f) Erythema was measured every days following intradermal injection of tuberculin in all animals.

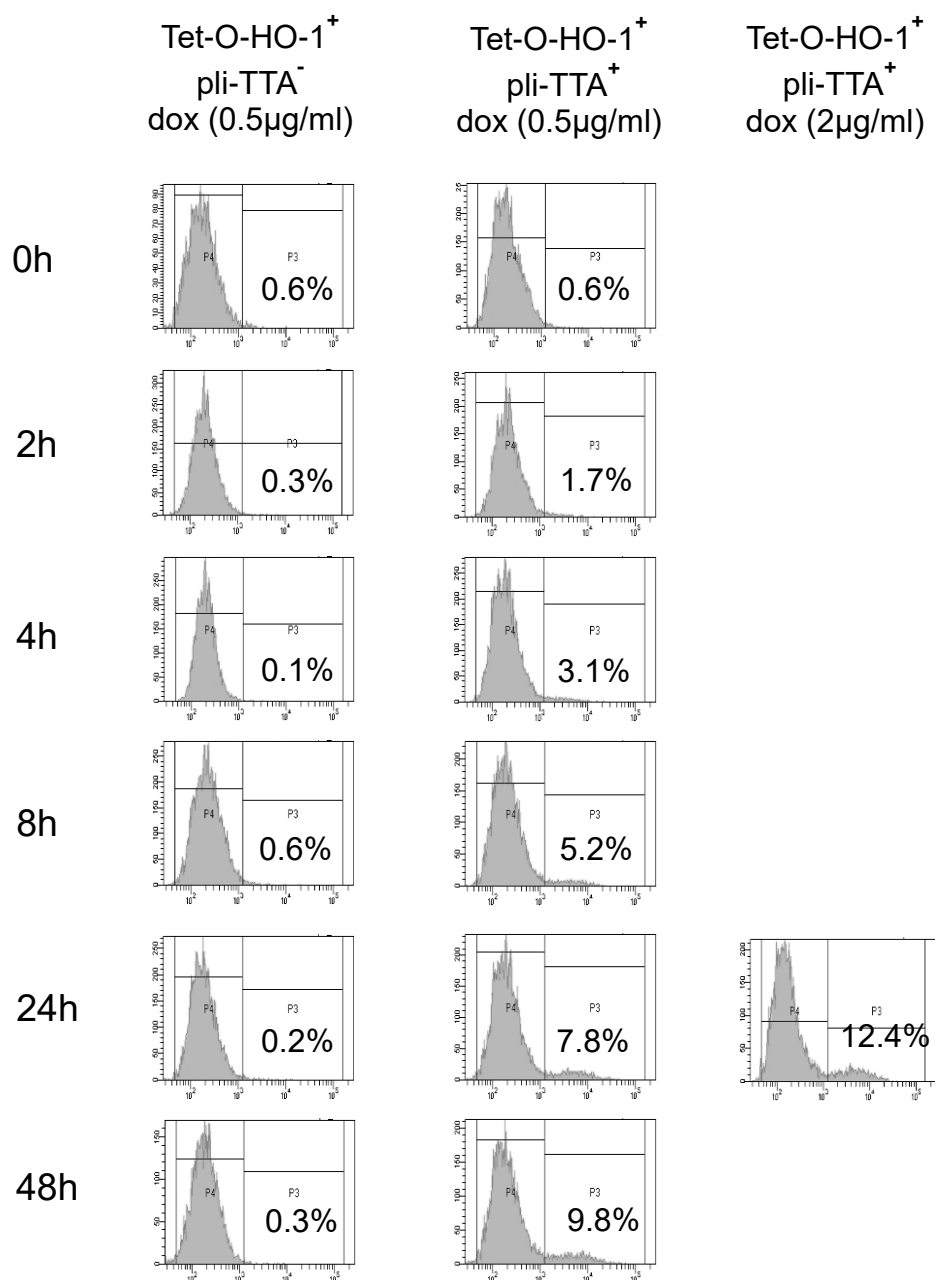
Supplementary Table Legends

Table S1: List of genes differentially expressed by CD8⁺ T cells obtained from OVA and CoPP/OVA injected mice. Mice were i.d. immunized with OVA or CoPP-OVA and 24 h later they were transferred with 0.5×10^5 autoreactive CD45.1⁺ CTLs. Six days after transfer, CD45.1⁺ CD8⁺ T cells were sorted by flow cytometry and analyzed by microarray. Shown are the Illumina probe IDs, the gene symbols and the ratios of the OVA CD8⁺ T cells vs CoPP/OVA CD8⁺ T cells expression values of genes selected based on a fold change

PROBE_ID	SYMBOL	ratio
ILMN_1377923	Actb	2,99
ILMN_2769777	Msc	2,46
ILMN_2699052	Nrn1	2,45
ILMN_1248734	OCC-1	2,30
ILMN_1229256	Bzap1	2,19
ILMN_2504686	mt-Atp6	2,03
ILMN_2900653	Gadd45b	0,50
ILMN_2705119	LOC100047353	0,48
ILMN_2744890	Gadd45g	0,48
ILMN_2977076	Gm12253	0,48
ILMN_1230073	Rn18s	0,47
ILMN_2531737	Dusp5	0,47
ILMN_1219200	P2ry14	0,46
ILMN_2526938	Pydc4	0,44
ILMN_1233117	E030040G24Rik	0,43
ILMN_2954868	Oasl2	0,42
ILMN_2681670	Vps37b	0,42
PROBE_ID	SYMBOL	ratio
ILMN_1230458	Ifit3	0,42
ILMN_2722938	Myd116	0,41
ILMN_1225204	Rsad2	0,41
ILMN_1229197	Gm14446	0,41
ILMN_2878071	Lyz	0,40
ILMN_1218240	Cd69	0,40
ILMN_3054914	Usp18	0,36

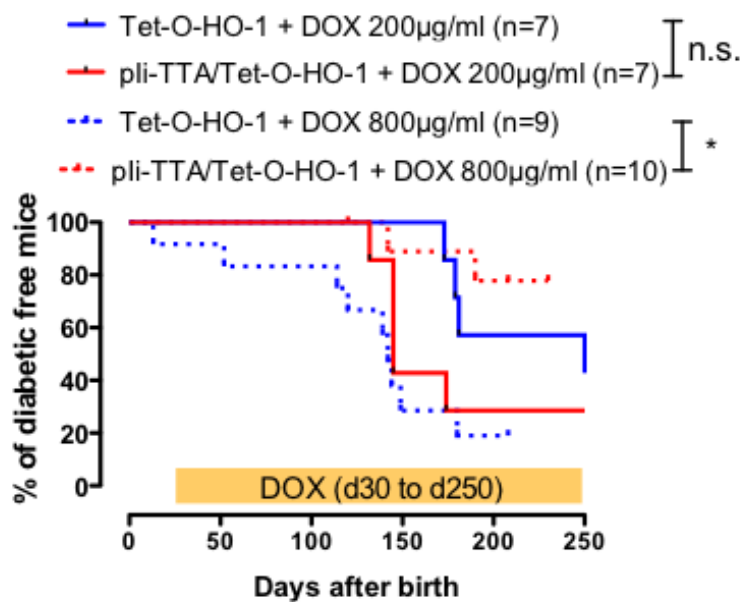
ILMN_1256257	ISG15	0,34
ILMN_1248139	Gp49a	0,34
ILMN_1246194	LOC667370	0,33
ILMN_2670150	Oas2	0,32
ILMN_2433990	UBP43	0,30
ILMN_2944666	Ifit3	0,29
ILMN_3131679	Usp18	0,28
ILMN_2628822	Oas1g	0,28
ILMN_1253808	Oas1g	0,25

Supplementary figure 1



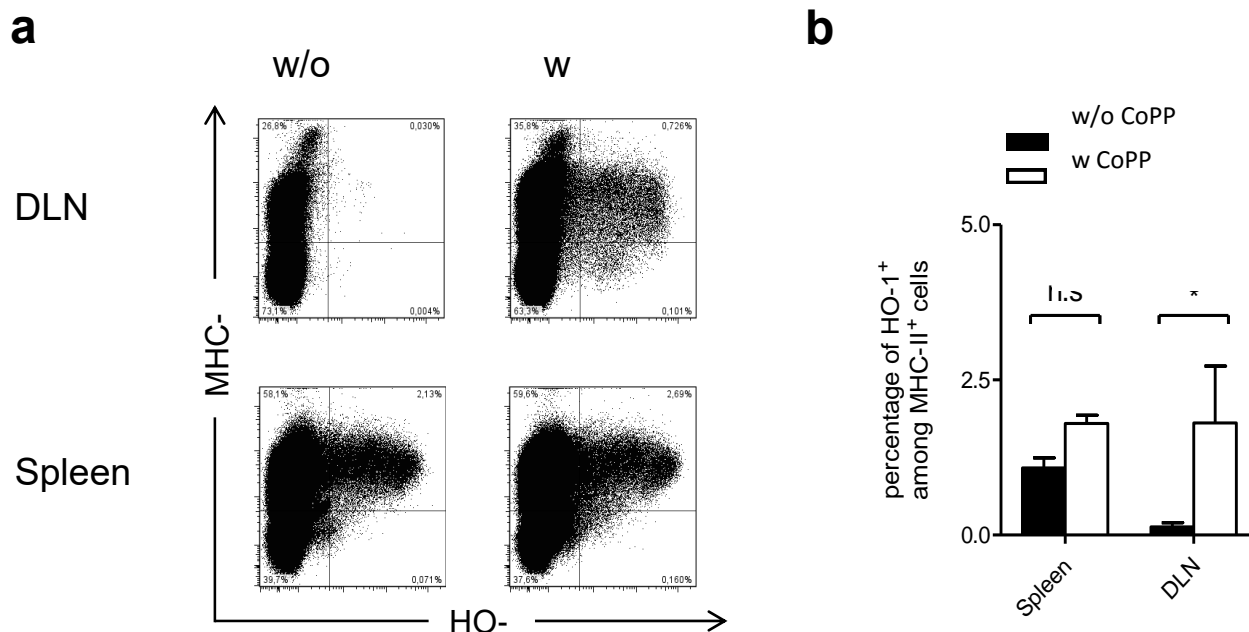
Supplemental figure 1. Temporal HO-1 induction in bone marrow-derived dendritic cells with the Tet ON system. Kinetics of HO-1 expression following doxycycline (DOX) addition *in vitro* to bone-marrow-derived DCs from double Tet-O-HO-1 pIi-TTA or simple pIi-TTA transgenic mice. HO-1 expression over time following doxycycline (DOX) addition to culture media was analyzed by FACS. Data shown as one representative FACS profile out of three after gating on CD11c⁺ cells. Numbers indicate percentage of HO-1 positive cells.

Supplementary figure 2



Supplemental figure 2. Diabetes incidence curve in NOD Tet-O-HO-1 pIi-TTA mice after doxycycline treatment. Double Tet-O-HO-1 pIi-TTA or simple pIi-TTA transgenic mice were treated with doxycycline (DOX) in drinking water, and mice were monitored for diabetes development. Two different doses of DOX in the drinking water were tested. Data show survival curve. * $P < 0.05$.

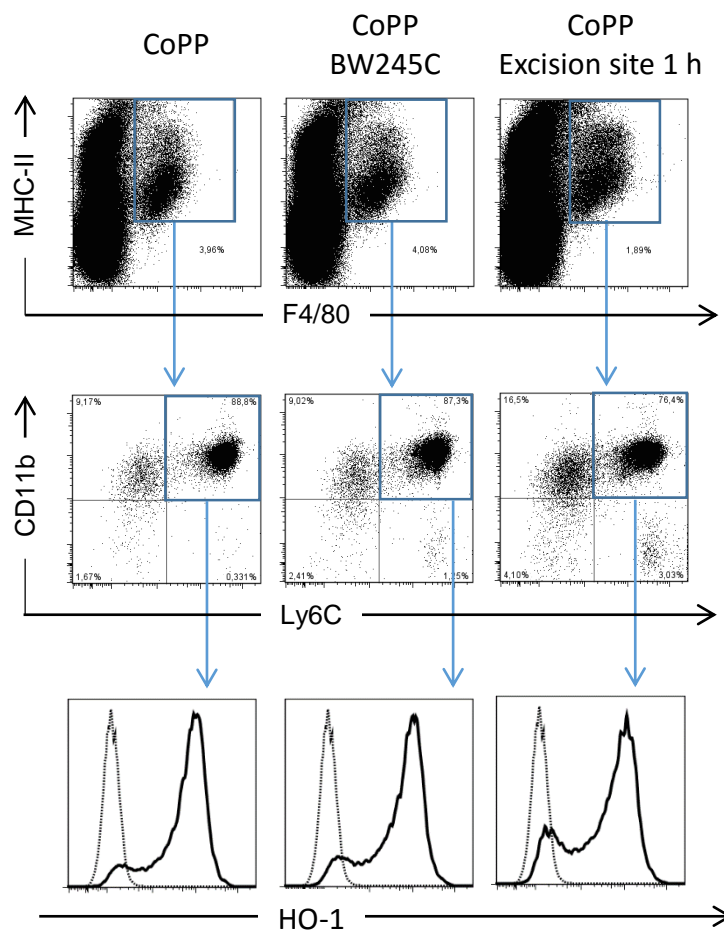
Supplementary figure 3



Supplemental figure 3. Intradermal injection of CoPP and autoantigen induces HO-1 in MHC-II⁺ cells in the draining LN.

(a,b) Twenty-four hours after intradermal injection of OVA protein with (w CoPP) or without (w/o CoPP) HO-1 inducer in C57/B6 mice, the proportion of HO-1⁺ cells among MHC-II⁺ cells was determined in splenocytes and draining LNs by FACS. Data are shown as a representative density plot (a), and as mean frequencies \pm s.e.m. of three independent experiments ($n \geq 3$ mice/group) (b).

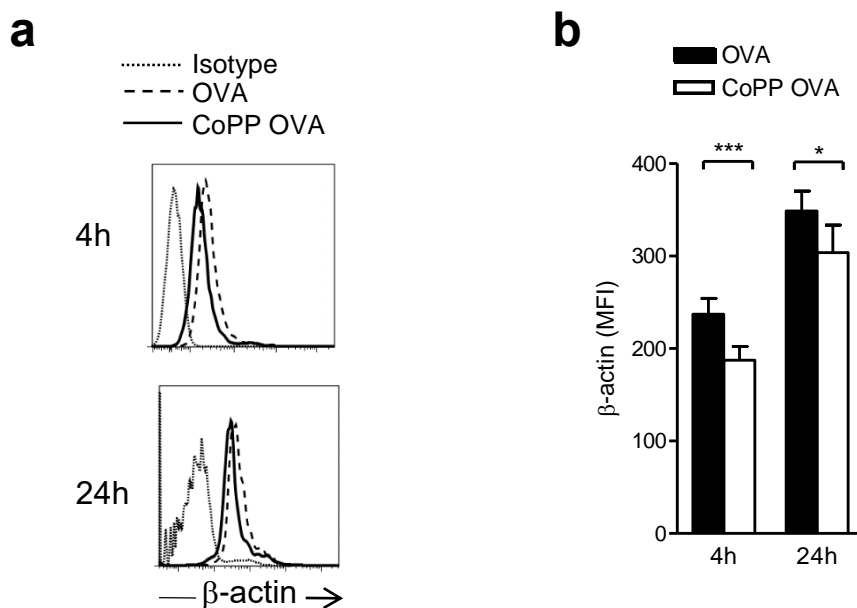
Supplementary figure 4



Supplemental figure 4. Origin of HO-1-induced MoDCs.

MoDCs population were analyzed as in Fig. 4b in Copp-OVA treated C57/B6 mice in presence of BW245c as a dermal migration inhibitor or after excision of the injection site one hour after intradermal immunization.

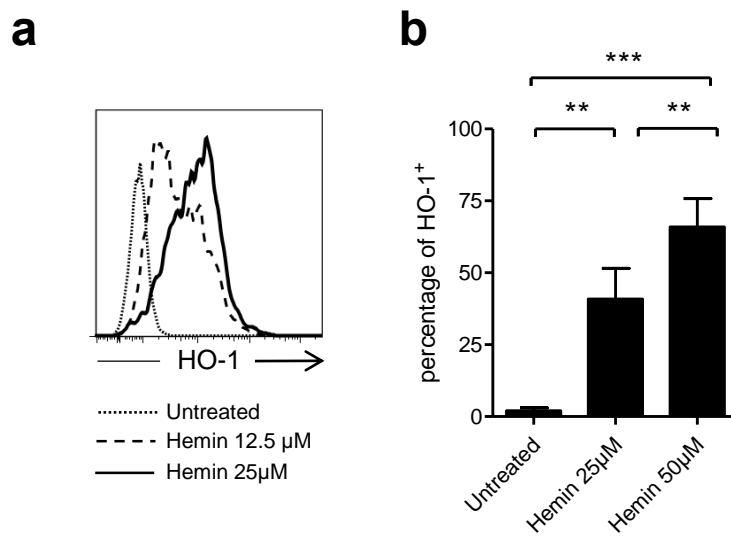
Supplementary figure 5



Supplemental figure 5. Beta-actin expression on CTLs after coculture with MHC-II⁺ cells from CoPP treated or untreated mice.

(a,b) β -actin expression on autoreactive CTLs co-cultured with MHC-II⁺ cells isolated from draining LN of OVA- or CoPP-OVA-immunized mice. Data shown as representative FACS profile (a) and mean \pm s.e.m. of three independent experiments ($n = 6$ mice/group) (b). * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

Supplementary figure 6



Supplemental figure 6. Treatment of PBMCs with hemin in non-human primates induces HO-1 in MHC-II⁺CD11c⁺CD14⁺ cells.

(a,b) PBMC from baboon were analyzed for HO-1 expression expression 4 hours after *in vitro* hemin treatment. (a) Data show a FACS profile from one baboon and (b) mean frequencies ± s.e.m of three baboons.

ONLINE METHODS

Cells.

Autoreactive CTL generation. Autoreactive CTLs were generated as described previously ²². Briefly, CD8⁺ cells were isolated by magnetic selection (Miltenyi Biotech) from OVA-specific class I-restricted T cells (OT-I) mice ²³ spleen and lymph node single-cell suspensions. 1×10^6 purified OT-I CD8⁺ T cells were stimulated with 5×10^6 mitomycin-treated and ovalbumin (257-264) peptide-loaded syngeneic spleen cells in 2 ml complete DMEM high glucose with stable glutamine (PAA) supplemented with 10% FCS (Eurobio) containing, 5 ng/ml IL-2 (Roche Applied Science), and 20 ng/ml IL-12 (R&D Systems). On day 3, the cultures were split into four aliquots and fed with fresh medium containing IL-2. On day 6, cells were collected and washed with culture medium at three times.

Isolation of murine APCs and co-culture with autoreactive CTLs. For MHC-II⁺ and F4/80⁺ cells isolation, skin-draining LNs were removed 24 hours after intradermal injection in the back or in the ear. Single-cell suspensions were prepared by enzymatic lymph node disaggregation with collagenase D (Sigma-Aldrich). Cells were stained with anti-MHC-II-FITC (clone AF6-120.1, BD pharmingen) or anti-F4/80-PE (clone BM8, eBioscience) monoclonal antibodies as primary labeling reagent and respectively with anti-FITC or anti-PE microbeads (Miltenyi) as secondary reagent. After magnetic separation, we checked that purity was >82% for CD11b⁺Ly6C^{high}F4/80⁺ cells in CoPP-OVA immunized mice. These cells were co-cultured with autoreactive CTLs (respectively 1:1 and 1:5 APC to CTL ratio) overnight for velocity measurement and transwell migration assay.

Human THP-1 monocytic cell line and co-culture with CD8⁺ T cells clones. THP-1 cells were cultured in RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Eurobio), 1% glutamine (Gibco), 50 IU/mL penicillin 50 IU/mL streptomycin (Gibco) and 200nM PMA (Sigma-Aldrich) under standard conditions as previously described ²⁴.

For co-culture experiments with CD8⁺ T cells clones, THP-1 were treated with hemin (25µM or 50µM) or CoPP (12.5µM or 25µM) overnight, pulsed 30 min at 37°C with 5µM of MUC1 (950–958) in culture medium, thoroughly washed and cocultured respectively with HLA-A*0201/MUC1(950–958)-specific T-cell clone (N5.14)²⁵ at ratio 1:1 overnight for velocity measurement.

Human PBMC. Human PBMC were obtained at the Etablissement Français du Sang in Nantes from blood of healthy donors. After Ficoll-Paque density gradient centrifugation (GE Healthcare), PBMC were cultured in RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Eurobio), 1% glutamine (Gibco), 50 IU/mL penicillin 50 IU/mL streptomycin (Gibco) in presence or not of CoPP or hemin during 4 hours.

Animals.

Non-Human primates. Baboons (*Papio anubis*, from the CNRS Primatology Center, Rousset, France) were negative for all quarantine tests. Animals were housed at the large animal facility of our laboratory following the recommendations of the Institutional Ethical Guidelines of the Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale, France. All experiments were performed under general anaesthesia with Zoletil (Virbac, Carron, France). Three Baboons were injected intradermally in the inguinal fold with respectively 6.25mg (500µL), 12.5mg (500µL) or 25mg (1mL) of clinical hemin (Normosang®). A non-treated baboon has served as control. Inguinal lymph nodes were surgically removed 24 hours after intradermal injection. Single-cell suspensions for flow cytometry analysis were prepared by enzymatic lymph node disaggregation with Collagenase D (Sigma-Aldrich).

Mice. The Rip-OVA^{high} transgenic mice²⁶ express OVA in pancreatic islets and the OT-I CD45.1⁺ transgenic mice express a TCR-specific for the H2Kb restricted (SIINFEKL) epitope of OVA and the CD45.1 congenic marker. 2D2 mice express a TCR-specific for the H-2b restricted (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) epitope of Myelin Oligodendrocyte

Glycoprotein (MOG). Rip-OVA^{high}, 2D2, OT-I CD45.1⁺, and C57/BL6 mice were obtained through Jackson Laboratory (Rip-OVA^{high}, 2D2), Charles River (OT-I CD45.1⁺), and Janvier (C57/BL6). All mice were used between 6 and 12 weeks of age.

All animal breeding and experiments were performed under conditions in accordance with the Inserm and European Union Guidelines.

Doxycycline treatment.

Doxycycline hyclate powder (Sigma-Aldrich) was diluted in drinking water at different concentration (200µg/mL up to 800µg/mL) and protected from light. HO-1 transgenic mice have been treated during 3 days for HO-1 expression analysis and up to 200 days for diabetes incidence experiments.

Intradermal immunization of mice.

Eight to ten week-old Rip-OVA^{high} mice received two intradermal injections in the back with 70µg of CoPP (Livchem) prepared as described and 20µg of endofree ovalbumin (Hyglos) in 10µl. One hundred and forty micrograms of MnPP (Livchem) prepared as described¹³ was added to the preparation for HO-1-inhibition experiments. Forty micrograms of Alexa Fluor® 488 ovalbumin (Molecular Probes) has been used for phagocytosis assay.

For experiments with BW245c protocol was adapted form (40). Briefly, mice were sensitized by painting with approximatively 10 µl of a 1% solution of FITC prepared in acetone/dibutylphtalate (1:1, vol/vol; vehicle) on the total surface of the ear. 10 µl of BW245 (200 nM) or PBS (vehicle) was injected intradermally 15 min before fitc painting. To determinate the number of migrating FITC-positive cells a single cell suspensions were prepared from superficial cervical lymph node and then isolated from tissue by collagenase D digestion. The percentage of FITC⁺ lymph node cells was determined by flow cytometry.

Diabetes induction in Rip-OVA^{high}.

For diabetes induction, Rip-OVA^{high} mice were injected i.v. with 0.5×10^5 autoreactive

cytotoxic OT-I CD8⁺ T cells (purity >95%) previously co-cultured or not with MHC-II⁺ or F4/80⁺ cells during 4 hours. Glycemia was monitored every days starting from day five. Mice were considered diabetic when urine glycosuria was positive for two consecutive days.

Diabetes follow-up in NOD mice.

Diabetes monitoring has been done by urine glycosuria analysis and confirmed in positive mice (5.5 mmol/L) by blood glycemia measurement. Mice were considered diabetic when blood glycemia was superior to 180mg/dL during two consecutive weeks for HO-1 transgenic NOD models.

EAE induction.

As describe in (14), EAE was induced in C57BL/6 by subcutaneous injection of emulsified complet freund adjuvant (CFA) (sigma aldrich) complemented with 400µg of mycobacterium tuberculosis (BD) and 200µg of MOG₃₅₋₅₅ ClassII peptide (GeneCust). Two-hundred nanogram of Pertussis toxin (VWR) was intravenously injected at the time of immunization and two days later. Clinical signs of EAE were evaluated daily and scored as follows: 0, normal; 1, limp tail; 2, partial paralysis of the hind limbs; 3, complete paralysis of the hind limbs. For prophylactic treatment, mice were treated or not at the time of EAE induction with either two intradermal injection of MOG₃₅₋₅₅ peptide only (20µg), or CoPP (70µg) plus MOG₃₅₋₅₅ peptide (20µg), or with CoPP plus (70µg) and irrelevant peptide OVA₃₂₃₋₃₃₉ ClassII peptide (20µg), Then same injections were repeated twice three days appart. For curative treatment, mice were treated as described above except that the treatment starts when mice scored positive for EAE.

Flow Cytometry

Spleen and lymph node were digested in collagenase D (Roche) during 30 min at 37°C then crushed and filtered on 70µm tamis before staining. Single-cells suspensions were stained with anti-CD8 (clone 53-6.7), anti-CD45.1 (clone A20), mouse F4.80 (BM8, eBioscience),

mouse Ly6C (AL-21, BD), mouse Ly6G (1A8, BD), mouse CD11c (HL3, BD), mouse CD64 (X54-5/7.1, BioLegend), mouse Fc ϵ r1 (MAR-1, BioLegend), mouse I-Ab (AF6-120.1, BD), mouse CD11b (M1/70, BD) antibodies. All antibodies are from BD Biosciences. Intracellular staining of HO-1 using BD cytofix/cytoperm kit following manufacturers' recommendations were performed with anti-HO-1 antibody (clone HO-1-2, abcam) as primary labeling reagent and with anti-anti-IgG1 (clone MOPC-21) monoclonal antibody conjugated to a fluorochrome as secondary labeling reagent.

Isotype antibodies (Immunotech) were used as a negative control. Staining was assessed using a FACScanto flow cytometer and Diva 6.1 software (Becton Dickinson).

MOG-specific CD4⁺ T-cells proliferation assay.

C57Bl/6 (CD45.1) mice were immunized with MOG₃₅₋₅₅ peptide as describe above and received prophylactic treatment. Six million CFSE-labeled CD4⁺ T-cells negatively selected from 2D2 (CD45.2) mice were i.v. injected the same day mice. Four days later receivers were sacrificed, their spleen and lymph node were harvested and cells were stained with anti-CD3 (145-2C11; BD), anti-CD45.2 (104; BD) and anti-CD4 (RM4-5; BD) antibodies and analyzed by flow cytometry.

MOG₃₈₋₄₉ tetramer staining:

CNS infiltrating cells derived from MOG-CFA immunized mice were harvested and stained with MOG₃₈₋₄₉-APC tetramer (National Institutes of Health Tetramer Facility) for 3h at 37°C in the dark. After cell sorting using CD4⁺ T-cells negative selection kit (MiltenyiBiotech) from draining lymph node and spleen, a surface staining with mouse CD3 (145-2C11; BD Bioscience), and mouse CD4 (RM4-5; BD Bioscience) antibody was performed along with the tetramer staining described above.

In vivo cytotoxicity assay

Spleen cells from C57/Bl6 mice were pulsed or not with 5 μ M of H2-Kb Ovalbumin (257-264) peptide for 30 min at 37°C and incubated 5 min at RT in PBS containing 5 and 0.5 μ M CFSE respectively. For in vivo cytotoxic test, 3 x 10⁶ of OVA (257-264) peptide and unpulsed splenocytes were co-injected i.v. into recipient mice. Mice were killed 12 h later, and spleen cells were analyzed by flow cytometry. Cytolytic activity was determined by calculating the percentage of specific lysis using the following formula: 100-([(Ovalbumin (257-264)-pulsed splenocytes/ unpulsed splenocytes) with autoreactive CTLs/ (%Ovalbumin (257-264) pulsed splenocytes /% unpulsed splenocytes) without autoreactive CTLs] x 100).

CNS and Lymph node cells cytokine staining.

CNS-infiltrating cells were stimulated for 4 h with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and ionomycin in the presence on GolgiStop (BD) in complete medium. Then cells were stained for surface molecules, fixed, and made permeable with Fixation and permeabilization concentrate (ebioscience) and stained with the following antibodies: mouse CD3 (145-2C11; BD), mouse CD4 (RM4-5;BD).

Histological analysis.

For evaluation of insulinitis or CNS inflammation, pancreas and brain or spinal cord respectively were snap-frozen and cryosections (8 μ m thick) were acetone-fixed. Sections were stained with Hematoxylin and Eosin or Luxol fast blue stains (Thermo Electron Corp.), and the degree of inflammation was evaluated microscopically. The extension of insulinitis was determine as the percentage of normal, peri-infiltrated, infiltration of <50% of islet area, or infiltration of >50% of islet area.

Light-sheet-based fluorescent microscopy analysis.

Animals were perfused with PFA 4% and washed with PBS. Excised pancreases were clarified using the 3Disco method^{27,28}. Briefly, They were dehydrated at room temperature in

successive bathes from 50% TetraHydroFuran, anhydrous (THF, Sigma, Saint Quentin Falavier, France) (vol/vol) overnight, 80% THF (vol/vol) for 2 hours to 100% THF two times 1 hour. Then the organs are incubated in a solution of 100% Di-ChloroMethan (DCM, Sigma, Saint Quentin Falavier, France) for 45 minutes and transferred overnight into in the clearing medium 100% DiBenzylEther 98% (DBE, Sigma, Saint Quentin Falavier, France). To image whole adult mice pancreas, we use a home-made light-sheet ultramicroscope²⁷. The specimen was placed into a cubic cuvette filed with DBE placed on the Z-stage of the bench. It was illuminated with planar sheets of light, formed by cylinder lenses. The light coming from a multi-wavelength (405, 488, 561, 635nm) laser bench (LBX-4C, Oxxius, Lannion, France) was coupled via two single mode optical fibers into the setup, allowing illumination from one or two sides. Illumination intensity using the 488 nm laser excitation was 10 to 40 mW per light sheet. We used two-sided illumination. The specimen was imaged from above with a MVX10 microscope, through a PlanApo 1X/0.25 NA or 2X/0.5 NA objective (Olympus, Rungis, France), which was oriented perpendicular to the 488nm light sheet. For GFP fluorescence imaging, we used a 525/50 band pass filter on the turret. Images were captured using a CCD Camera (ORCA AG, Hamamatsu, France) synchronized with the z-stage moving the sample through the light sheet. The home-made ultramicroscope is managed by Micro-manager software and z-stacks of images were taken every 20, 10 or 5 microns depending on the sample and magnification. The images stacks are analyzed using ImageJ software (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012).

Velocity assay

Autoreactive CTLs were cocultured overnight with MHC-II⁺ cells isolated from DLNs of OVA or CoPP-OVA immunized mice. After magnetic depletion of MHC-II⁺ cells, re-isolated CTL were settled on a confluent SVEC cells monolayer seeded on ibidi μ slide. Live cell

imaging was performed at 37°C using DMI 6000 B microscope (Leica Microsystems, Nanterre, France) under 20× magnification. Images were acquired every 15 s for 30min with a Cool Snap HQ2 camera (Roper, Tucson, AZ) and analyzed with Metafluor 7.1 imaging software (Universal Imaging, Downington, PA). The images were imported into the ImageJ software program, and manual cell tracking was performed using the MTrackJ plug-in (developed by Erik Meijering at the University Medical Center Rotterdam, Rotterdam, The Netherlands; <http://www.imagescience.org/meijering/software/mtrackj/>). The average velocity was calculated for each cell by dividing the total distance traveled by the cell during the last ten minutes.

Transwell migration assay

Autoreactive CTLs were cocultured with MHC-II⁺ cells isolated from DLNs of OVA or CoPP-OVA immunized mice. After magnetic depletion of MHC-II⁺ cells, re-isolated CTL were deposited on the upper chamber containing a polycarbonate transwell membrane filter (5-µm pore size; Corning). The lower chamber contained 100 ng/ml CXCL12, 100 ng/ml CCL19, or 80 ng/ml CCL17 in DMEM complete medium. The recovered cells after 2 hours at 37°C were analyzed by flow cytometry.

Cytokine measurement

MHC-II⁺ mice cells or PMA-activated THP-1 cells were treated with CoPP or hemin as described for mouse and cultured for 24 hours with LPS at 1µg/mL. Supernatants were serially diluted, and cytokine concentration assessed in duplicate by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Mouse ELISA kits for IL-12 and IL-10, as well as human IL-1β ELISA kits (BD) were used.

BCG vaccination and DTH assay.

Baboons were immunized intradermally twice with a bacillus Calmette–Guérin (BCG) vaccine (0.1 ml; 2–8 x10⁵ UFS; Sanofi Pasteur MSD, Lyon, France) in the upper region of

the leg, 4 and 2 weeks before the delayed type hypersensitivity (DTH) skin test. Intradermal reactions (IDR) were performed in the back with duplicate intradermal injections of two doses (2000 UI or 40 UI) of tuberculin-purified protein derivative (PPD; Symbiotics Corporation, San Diego, CA, USA) in 0.1 ml in the skin on the right back of the animals. Saline (0.1 ml) was used as a negative control. Dermal responses at the injection sites were measured using a caliper square. The diameter of each indurated erythema was measured by two observers from days 3–8, and were considered positive when > 4 mm in diameter. The mean of the reading was recorded. Other IDRs were performed four days, one, two and three month after animals received one i.d. injection of hemin (Normosang) and 2000 UI of tuberculin-purified protein derivative.

Statistics

For diabetes incidence, significance was calculated using the log-rank test. For all other parameters, significance was calculated by *t*-paired test, Mann–Whitney nonparametric *t*-test . one-way anova or two-way anova using Prism software: $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, and $***p < 0.001$.

Studies approvals

All animal breeding and experiments were performed under conditions in accordance with the Inserm and European Union Guidelines. All animals experimental protocols received a local and national committee approval.

Discussion et perspectives

Discussion et perspectives :

Les effets bénéfiques de l'induction systémique de l'HO-1 par des agents chimiques (CoPP ou Hemine) ou par thérapie génique (AAVHO-1) ont montré leur efficacité pour inhiber le développement de réponses auto-immunes dans des modèles de DT1 [350] ou d'EAE [348]. Dans, ces études, du fait de l'aspect systémique des traitements utilisés les mécanismes expliquant cette protection ne sont pas totalement élucidés. Cependant, dans la majorité des cas il est rapporté la présence de CPA exprimant l'HO-1. De façon intéressante, nous avons mis en évidence que dans des souris NOD développant le DT1, l'expression de l'HO-1 au niveau des CPA est significativement diminuée, comparée à des CPA isolées de souris NOR ne développant pas le DT1. Nous avons pu démontrer dans un modèle de souris double transgénique que la restauration de l'expression de l'HO-1 dans ces CPA est associée à une inhibition du DT1 confirmant le potentiel tolérogène des CPA exprimant l'HO-1.

Ces observations nous ont amené à développer un protocole de tolérance antigène spécifique, basé sur l'administration intradermique d'un inducteur de l'HO-1 et d'un auto-antigène. Le choix de la voie d'administration du traitement repose sur la nécessité d'induire une expression localisée de l'HO-1. En effet, une induction systémique de l'HO-1 entrainerait une immunosuppression généralisée qui n'était pas souhaitée dans cette étude. De ce fait, bien que décrit comme étant une voie d'administration pro-tolérogène, nous avons écarté l'idée d'administrer notre traitement au niveau des muqueuses trop densément irriguées par la circulation sanguine. Nous avons mis en évidence que ce protocole permet l'inhibition antigène spécifique de LTCD8 activés et LTCD4, respectivement dans un modèle de DT1 et d'EAE. Ces résultats sont différents de ceux obtenus dans les modèles de DT1 et d'EAE décrits plus haut à de nombreux égards. Tout d'abord, la voie d'administration est notablement différente, puis l'injection intradermique permet un induction locale,

contrairement à l'injection intraveineuse [350] ou intraperitoneale [348] de l'HO-1. Par ailleurs, les doses de CoPP utilisées dans notre étude sont inférieures à celles utilisées dans le cas de la protection l'EAE [348] et ne sont pas suffisantes pour induire une tolérance *per se*. La protection que nous obtenons suite à l'injection intradermique de CoPP est spécifique d'antigène, ce qui n'est pas le cas des articles décrits plus haut. Enfin, concernant le mécanisme, il a été montré que, dans les deux cas, les lymphocytes T pathogéniques CD4⁺ ou CD8⁺ sont moins nombreux en périphérie chez les animaux traités que chez les animaux témoins expliquant ainsi la protection [348]. Dans notre modèle, les précurseurs pathogéniques sont en nombre identique dans les deux groupes, seule diffère leur capacité de migration dans les tissus. Ce mode de tolérisation constitue un moyen tout à fait original de tolérisation vis-à-vis de maladies auto-immunes.

Nous avons démontré que cette protection est dépendante de l'activité de l'HO-1 car inhibée en présence de MnPP un inhibiteur de l'activité enzymatique de l'HO-1. Cependant, l'utilisation des métalloporphyrines comme inducteurs de l'HO-1 (tel que le CoPP ou encore l'Hemine) peut poser question. En effet, comme nous l'avons vu ces derniers induisent l'HO-1 principalement en activant Nrf2 et en réprimant Bach-1. Or, ces facteurs de transcription sont impliqués dans la régulation de nombreux gènes [354] tels que le gène de la quinone oxydoréductase (NQO-1), ou de la glutathione S-transferase (GST) ou encore de la glutamate-cystéine ligase (GCL), soulignant l'action potentiellement aspécifique des inducteurs de l'HO-1 [250]. Le fait que l'ajout de MnPP au CoPP soit associé à une perte de protection semble toutefois confirmer que la protection est médiée par l'activité enzymatique de l'HO-1.

Afin de définitivement démontrer que la protection est dépendante de l'activité de l'HO-1 il serait intéressant d'utiliser des souris KO pour hmox-1. Cependant, l'absence de ce gène est associée à un fort taux de mortalité chez les souris, rendant l'utilisation de ce modèle difficile. Afin de contourner ce problème nous avons envisagé d'utiliser trois types de

modèles de souris transgéniques. Le premier modèle est appelé Rosa26ERT2Crehmx-1lox/lox et est un modèle de KO inducible par le tamoxiphène. Dans ce modèle toutes les cellules expriment l'enzyme recombinase Cre-ERT2. De plus, le gène de l'HO-1 est encadré par deux séquences lox permettant la délétion du gène suite à la fixation de l'enzyme recombinase Cre-ERT2. Cependant, en absence de tamoxiphène cette dernière n'est pas capable de pénétrer dans le noyau et donc de déléter hmx-1. Le traitement au tamoxiphène permet l'entrée de Cre-ERT2 dans le noyau et la délétion d'hmx-1. Cependant, une analyse par PCR quantitative réalisée sur des cellules isolées du sang a révélé que, malgré le traitement au tamoxiphène, une expression d'ARNm spécifique de l'HO-1 résiduelle est observée (environ 10% du niveau d'expression retrouvé dans les cellules isolées de souris contrôles). Le deuxième et troisième modèle que nous avons voulu évaluer sont des modèles de délétions de l'hmx-1 cellules spécifiques. Dans ces deux derniers Cre n'est plus associé à ERT2 mais est sous dépendance du promoteur du lysozyme exprimé uniquement par les cellules d'origines myéloïdes[355]. Ainsi, seules les cellules myéloïdes exprimeront Cre qui, comme il n'est pas associé à ERT2, pourra pénétrer dans le noyau et déléter hmx-1 spécifiquement dans ces cellules. A la différence du deuxième modèle, le troisième modèle n'exprime plus qu'un des deux allèles de l'hmx-1, ce qui devrait en théorie améliorer l'efficacité de délétion de la Cre. Malheureusement, dans ces deux derniers modèles nous avons observé une induction de l'expression de l'HO-1 comparable à celle des souris contrôles dans les cellules CMHII positives issues du ganglion drainant le site l'injection de CoPP. Ces observations mettent en évidence la difficulté de déléter le gène de l'HO-1.

Comme nous l'avons démontré, l'injection intradermique d'un inducteur de l'HO-1 et d'un auto-antigène est associée au recrutement dans le ganglion drainant d'une population de DC dérivées de monocytes exprimant fortement l'HO-1 et internalisant l'auto-antigène administré. Nous avons mis en évidence que ces moDC sont capables de tolérer des LT CD8 pathogéniques après co-culture. Cependant, nos expériences ne nous permettent pas

d'écarter le rôle éventuel d'autres populations cellulaires dans la protection observée. En effet, suite à l'injection intradermique de l'inducteur de l'HO-1 nous avons identifié d'autres sous population cellulaires (CD11c+ F4.80- ou CD11c- F4.80-) exprimant l'HO-1 à des plus faibles niveaux (figure 24).

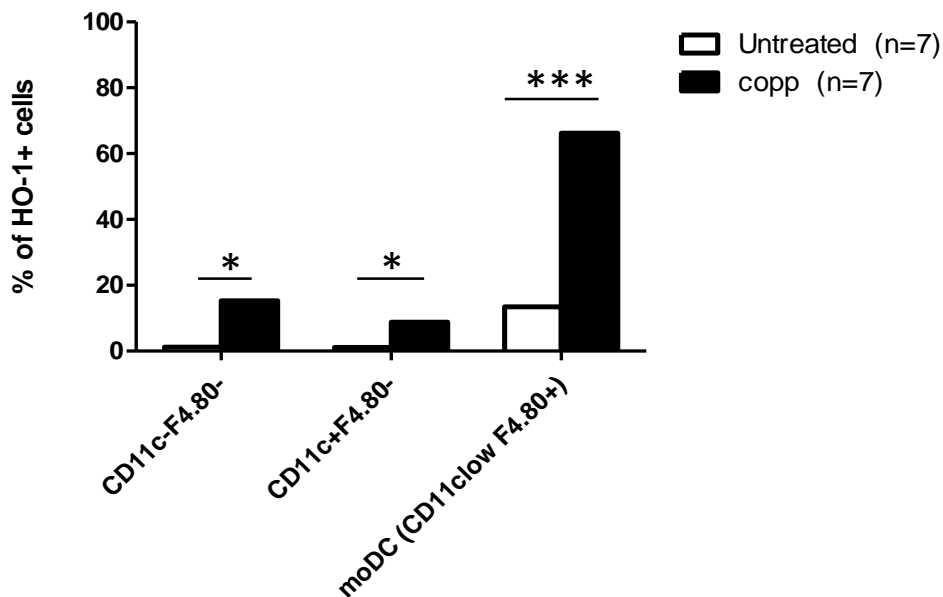


Figure 24: L'injection intradermique de CoPP induit l'expression de l'HO-1 dans différentes populations cellulaires du ganglion drainant le site de l'injection. Des souris sont traitées ou non par une injection intradermique de CoPP au niveau de l'oreille, 24 heures après l'injection, le ganglion drainant est récupéré et un marquage est réalisé avec les anticorps anti-CD11c, anti-F4.80 et anti-HO-1 et analysé par cytométrie en flux. Le % de cellules exprimant l'HO-1 en fonction du phénotype est représenté. (3 expériences indépendantes)

Afin d'écarter définitivement le rôle éventuel d'autres populations cellulaires que les moDC dans la protection, nous souhaitons évaluer l'efficacité de notre traitement dans des souris RipOVA^{hi} XCcr2^{-/-} dans le cadre du DT1 et dans des souris Ccr2^{-/-} dans le cadre de l'EAE. En effet, comme nous l'avons démontré l'injection intradermique d'un inducteur de l'HO-1 et d'un autoantigène dans des souris Ccr2^{-/-} n'induit pas le recrutement de moDC dans le ganglion drainant le site de l'injection. Ainsi, nous pourrions évaluer l'efficacité du

traitement en l'absence de moDC et déterminer si elles sont seules responsables ou non de la protection observée.

Nous avons mis en évidence que ces moDC exprimant l'HO-1 ont des propriétés tolérogènes en inhibant de façon antigène spécifique la capacité des LT à infiltrer l'organe cible. Leurs propriétés tolérogènes ne sont pas associées à une anergie ou une délétion clonale des LT. Ce mécanisme de tolérance s'apparente à de l'ignorance dans le sens où les LT ne sont plus en mesure d'atteindre l'organe cible où est exprimé leur auto-antigène. Afin de déterminer pourquoi les LT ne sont plus capables d'infiltrer l'organe cible, nous avons émis l'hypothèse d'une diminution de l'expression de molécules de la famille des intégrines ou encore des récepteurs aux chemokines acteurs majeurs de la migration des LT. Cependant, l'analyse d'un grand nombre de ces molécules n'a pas permis de mettre en évidence des différences d'expression suite au traitement (figure 25). Toutefois, un même niveau d'expression n'exclut pas une différence de fonctionnalité notamment pour les intégrines. Il a en effet été démontré que les intégrines peuvent se présenter sous deux formes, actives et inactives [356]. Ainsi, seuls des tests fonctionnels d'adhésion des LT tolérisés à différents ligands d'intégrines permettraient d'évaluer l'implication de ces molécules dans l'absence d'infiltration observée chez les souris protégées.

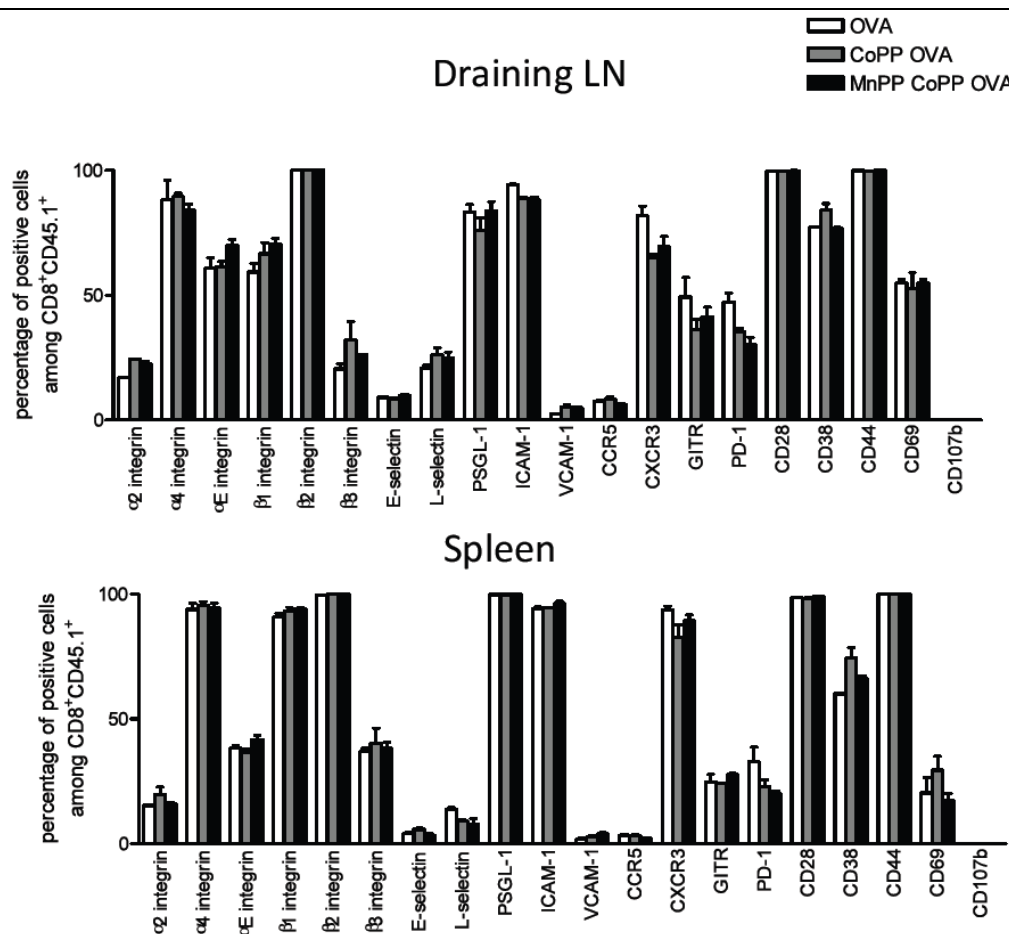


Figure 25: Phénotypage des LTCD8 spécifiques de l'OVA après traitement OVA ou CoPPOVA. 24 heures après l'injection intradermique d'OVA, CoPPOVA ou MnPPCoPPOVA, 50 000 CTL CD45.1 sont injectés dans des souris Rip-OVA^{hi}. 6 jours plus tard, l'expression de marqueurs de surface est analysée par cytométrie de flux. (n> 2 souris/ groupe), 3 expériences indépendantes.

Cependant, suite à une interaction avec les moDCHO-1+, les LT semblent présenter une altération de leur cytosquelette qui se traduit par une diminution de l'expression de la β -actine. Nous avons cherché à analyser par microscopie confocale l'organisation structurale de ce dernier. Cependant, les LT présentent un ratio N/C [357] (noyau-cytoplasme) très important 4 :1 qui ne nous a pas permis d'obtenir des images analysables. D'un point de vue fonctionnel, cette diminution de la β -actine s'accompagne d'une vitesse réduite et d'une capacité de migration altérée en réponse à différents gradients de chémokines.

Bien qu'ayant démontré la capacité des moDCHO-1+ à tolérer les LT pathogéniques nous n'avons pas encore identifié, à ce jour, la ou les molécules responsables de cette tolérance. Nous avons tout d'abord évalué la capacité des produits de dégradation de cette enzyme à tolérer des LTCD8 pathogéniques activés (Tc1 pour cytotoxic type 1 CD8+ T cells). Le traitement au CO de ces Tc1 avant leur réinjection n'a pas permis d'inhiber le développement du diabète écartant un effet paracrine du CO sur les LT pathogéniques (figure 26). Il serait intéressant d'évaluer l'impact d'autres produits de dégradation de l'HO-1 (bilirubine ou encore les ions ferreux) ou la combinaison des trois sur les LT pathogéniques.

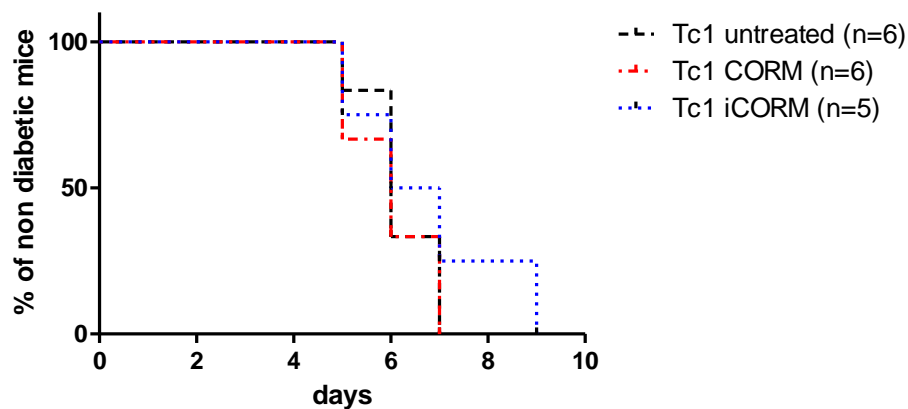


Figure 26: Incidence du DT1 après traitement ou non des Tc1 au monoxyde de carbone. Les Tc1 sont traitées ou non pendant 10 minutes avec du CORM ou iCORM à 50 μ M puis lavés deux fois et réinjectés par IV dans des souris Rip-OVA^{H1}. L'incidence du DT1 est représentée sous forme de graphique. (deux expériences indépendantes)

De plus, les moDCs présentent un profil cytokinique pro-tolérologène avec une sécrétion d'IL-10 significativement augmentée en réponse au LPS. Afin de déterminer le rôle de l'IL-10 dans la protection observée, nous avons administré un anticorps dirigé contre le récepteur à l'IL-10 pendant la période de traitement. Malgré la présence de l'anticorps la protection n'a pas été affectée, écartant le rôle de l'IL-10 (résultats non présentés).

Comme nous l'avons vu en introduction, l'expression de l'HO-1 dans les CPA peut être associée à la génération de LTreg. Afin de tester cette hypothèse nous avons administré un anticorps déplétant les cellules exprimant le CD4 pendant la période de traitement dans le modèle de DT1. La déplétion des LTCD4 dans le modèle de DT1 n'est pas associée à une perte de protection, écartant de fait le rôle des LTCD4reg (figure 27). Cependant, nous avons remarqué que, suite à la déplétion des LTCD4, les souris présentent un diabète particulièrement agressif avec certaines souris mourant dès 6 jours après l'injection des Tc1. Cette observation peut s'expliquer par l'absence de LTCD4reg. Les LTCD4reg ne semblent pas non plus être impliqués dans la protection observée dans le modèle d'EAE. En effet, nous n'avons pas observé de différences de nombre absolu de LT CD4+ CD25+ FoxP3+ entre des souris protégées et des souris contrôles. Cependant, il serait tout de même intéressant d'évaluer le rôle d'autres cellules régulatrices telles que le LTCD8reg ou les LBreg.

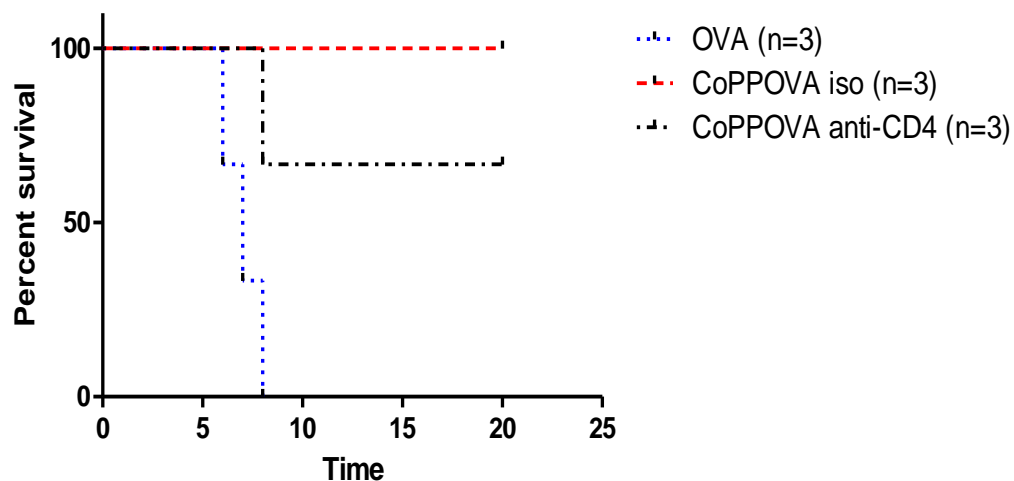


Figure 27: Incidence du DT1 après déplétion ou non des LTCD4. Les souris Rip-OVA^{hi} sont traitées ou non avec un anticorps anti-CD4 déplétant ou un isotype contrôle deux jours avant l'injection des Tc1 et tous les trois jours pendant 15 jours. Les souris sont traitées ou non par une injection intradermique de CoPP/OVA au niveau de l'oreille 24 heures avant l'injection de 50 000Tc1. L'incidence du DT1 est représentée sous forme de graphique. (une expérience est présentée)

Afin d'identifier de nouvelles voies de signalisations pouvant être impliquées dans la tolérisation des LT pathogéniques nous avons réalisé des puces à ADN sur des LTCD8 tolérisés isolés de souris protégées suite au traitement CoPP/OVA ainsi que sur des moDC HO-1+ tolérogènes. De façon intéressante, dans les deux populations cellulaires les résultats de ces puces mettent en avant une surexpression des gènes de la famille des interférons de type I et III, suggérant un rôle potentiel de cette voie dans la protection observée. Classiquement exprimés suite à une infection virale, les gènes de la famille des Interferons de type I et III ont un rôle méconnu dans un contexte auto-immun. Cependant, une étude récente, de Blazek et al [358] a démontré le rôle bénéfique de l'IFN de type III dans un modèle de polyarthrite rhumatoïde chez la souris. Ils démontrent qu'un traitement à l'IFN- λ 2/IL-28A reverse le développement de la maladie liée à une inhibition de la migration des neutrophiles. Sur la base de cette publication il serait intéressant de déterminer le rôle des IFN de type I et III dans la protection observée dans nos modèles.

Enfin, nous avons démontré l'efficacité de ce protocole d'induction de tolérance antigène spécifique chez le primate non humain. En effet, l'administration d'un inducteur de l'HO-1 utilisable en clinique (Normosang, hémine injectable) associé à la tuberculine abroge durant près de 3 mois la réaction de DTH vis-à-vis de la tuberculine. Ces résultats démontent, qu'une simple injection intradermique, permet d'inhiber une réponse vaccinale à moyen terme. Cette stratégie de vaccination « inversée » permettant une tolérance antigène spécifique présente de nombreux avantages au regard d'autres stratégies d'induction de tolérance. En effet, à la différence de l'administration de peptide soluble, elle s'avère efficace dans un modèle animal proche de l'homme, le babouin. De plus, l'utilisation d'un inducteur (Normosang) couramment utilisé en clinique pour traiter la porphyrie aiguë, ainsi que son action réversible, présente un gage de biosécurité bien supérieur à l'utilisation de nanoparticules, ou de la thérapie génique. Enfin, son mode d'administration permet une application simple et moins coûteuse qu'une thérapie cellulaire. Il serait ainsi intéressant

d'évaluer son efficacité chez l'homme dans le cadre de maladies auto-immunes où les principaux antigènes sont connus tels que le diabète de type 1 avec la co-administration de Normosang et de GAD65 ou encore d'insuline. Ce traitement pourrait aussi être évalué chez des patients hémophiles, développant une réaction immunitaire inhibant l'efficacité du facteur VIII qui leur est injectés [359].

En conclusion, au travers cette étude nous avons pu établir la preuve de concept de l'efficacité de l'injection intradermique d'un inducteur de l'HO-1 associé à un autoantigène dans le développement d'une tolérance antigène spécifique. Ce protocole présente l'avantage d'être testable rapidement en clinique grâce à l'utilisation d'inducteur de l'HO-1 (Normosang) possédant une autorisation de mise sur le marché. Cette tolérisation est associée à l'induction de moDC HO-1+ tolérogènes inhibant la capacité des LT pathogéniques à migrer dans l'organe cible.

Bibliographie :

- [1] R. E. BILLINGHAM, L. BRENT, and P. B. MEDAWAR, “Actively acquired tolerance of foreign cells.,” *Nature*, vol. 172, no. 4379, pp. 603–6, Oct. 1953.
- [2] J. Charles A Janeway, P. Travers, M. Walport, and M. J. Shlomchik, “The Development and Survival of Lymphocytes.” Garland Science, 2001.
- [3] K. Takada and Y. Takahama, “Positive-selection-inducing self-peptides displayed by cortical thymic epithelial cells.,” *Adv. Immunol.*, vol. 125, pp. 87–110, Jan. 2015.
- [4] F. Ramsdell and B. J. Fowlkes, “Clonal deletion versus clonal anergy: the role of the thymus in inducing self tolerance.,” *Science*, vol. 248, no. 4961, pp. 1342–8, Jun. 1990.
- [5] F. Melchers, “Checkpoints that control B cell development.,” *J. Clin. Invest.*, vol. 125, no. 6, pp. 2203–10, Jun. 2015.
- [6] S. Allen, S. Read, R. DiPaolo, R. S. McHugh, E. M. Shevach, P. A. Gleeson, and I. R. van Driel, “Promiscuous thymic expression of an autoantigen gene does not result in negative selection of pathogenic T cells.,” *J. Immunol.*, vol. 175, no. 9, pp. 5759–64, Nov. 2005.
- [7] D. Hawiger, K. Inaba, Y. Dorsett, M. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, J. V Ravetch, R. M. Steinman, and M. C. Nussenzweig, “Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo.,” *J. Exp. Med.*, vol. 194, no. 6, pp. 769–79, Sep. 2001.
- [8] M. Wållberg and A. Cooke, “Immune mechanisms in type 1 diabetes,” *Trends Immunol.*, vol. 34, no. 12, pp. 583–591, 2013.
- [9] D. Masopust and J. M. Schenkel, “The integration of T cell migration, differentiation and function.,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 13, no. 5, pp. 309–20, May 2013.
- [10] C. Mauri and A. Bosma, “Immune regulatory function of B cells.,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 30, pp. 221–41, Jan. 2012.
- [11] M. L. Kapsenberg, “Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization.,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 3, no. 12, pp. 984–93, Dec. 2003.
- [12] M. M. Davis and P. J. Bjorkman, “T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition.,” *Nature*, vol. 334, no. 6181, pp. 395–402, Aug. 1988.
- [13] T. P. Arstila, A. Casrouge, V. Baron, J. Even, J. Kanellopoulos, and P. Kourilsky, “A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity.,” *Science*, vol. 286, no. 5441, pp. 958–61, Oct. 1999.

-
- [14] R. N. Germain, "T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 2, no. 5, pp. 309–322, 2002.
- [15] P. Zarin, E. L. Y. Chen, T. S. H. In, M. K. Anderson, and J. C. Zúñiga-Pflücker, "Gamma delta T-cell differentiation and effector function programming, TCR signal strength, when and how much?," *Cell. Immunol.*, vol. 296, no. 1, pp. 70–5, Jul. 2015.
- [16] K. Hudspeth, M. Fogli, D. V Correia, J. Mikulak, A. Roberto, S. Della Bella, B. Silva-Santos, and D. Mavilio, "Engagement of NKp30 on V δ 1 T cells induces the production of CCL3, CCL4, and CCL5 and suppresses HIV-1 replication.," *Blood*, vol. 119, no. 17, pp. 4013–6, Apr. 2012.
- [17] D. I. Godfrey, J. Kennedy, T. Suda, and A. Zlotnik, "A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8-triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression.," *J. Immunol.*, vol. 150, no. 10, pp. 4244–52, May 1993.
- [18] S. Malu, V. Malshetty, D. Francis, and P. Cortes, "Role of non-homologous end joining in V(D)J recombination.," *Immunol. Res.*, vol. 54, no. 1–3, pp. 233–46, Dec. 2012.
- [19] J. Owen, J. Punt, and S. Stranford, *Immunologie - 7e édition: Le cours de Janis Kuby avec questions de révision*. Dunod, 2014.
- [20] S. Candéias, K. Muegge, and S. K. Durum, "Junctional diversity in signal joints from T cell receptor beta and delta loci via terminal deoxynucleotidyl transferase and exonucleolytic activity.," *J. Exp. Med.*, vol. 184, no. 5, pp. 1919–26, Nov. 1996.
- [21] P. C. Trampont, A.-C. Tosello-Trampont, Y. Shen, A. K. Duley, A. E. Sutherland, T. P. Bender, D. R. Littman, and K. S. Ravichandran, "CXCR4 acts as a costimulator during thymic beta-selection.," *Nat. Immunol.*, vol. 11, no. 2, pp. 162–70, Feb. 2010.
- [22] Y. Xing and K. a. Hogquist, "T-Cell tolerance: Central and peripheral," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 4, pp. 1–15, 2012.
- [23] K. A. Hogquist, S. C. Jameson, W. R. Heath, J. L. Howard, M. J. Bevan, and F. R. Carbone, "T cell receptor antagonist peptides induce positive selection," *Cell*, vol. 76, no. 1, pp. 17–27, Jan. 1994.
- [24] R. M. Zinkernagel and P. C. Doherty, "Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system.," *Nature*, vol. 248, no. 5450, pp. 701–2, Apr. 1974.
- [25] J. Charles A Janeway, P. Travers, M. Walport, and M. J. Shlomchik, "T-cell receptor gene rearrangement." Garland Science, 2001.
- [26] C. J. Guidos, J. S. Danska, C. G. Fathman, and I. L. Weissman, "T cell receptor-mediated negative selection of autoreactive T lymphocyte precursors occurs after

-
- commitment to the CD4 or CD8 lineages.," *J. Exp. Med.*, vol. 172, no. 3, pp. 835–45, Sep. 1990.
- [27] S. H. Chan, D. Cosgrove, C. Waltzinger, C. Benoist, and D. Mathis, "Another view of the selective model of thymocyte selection.," *Cell*, vol. 73, no. 2, pp. 225–36, Apr. 1993.
- [28] A. Itano, P. Salmon, D. Kioussis, M. Tolaini, P. Corbella, and E. Robey, "The cytoplasmic domain of CD4 promotes the development of CD4 lineage T cells.," *J. Exp. Med.*, vol. 183, no. 3, pp. 731–41, Mar. 1996.
- [29] K. Yasutomo, C. Doyle, L. Miele, C. Fuchs, and R. N. Germain, "The duration of antigen receptor signalling determines CD4+ versus CD8+ T-cell lineage fate.," *Nature*, vol. 404, no. 6777, pp. 506–10, Mar. 2000.
- [30] E. Brugnera, A. Bhandoola, R. Cibotti, Q. Yu, T. I. Guinter, Y. Yamashita, S. O. Sharrow, and A. Singer, "Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells.," *Immunity*, vol. 13, no. 1, pp. 59–71, Jul. 2000.
- [31] M. S. Anderson, E. S. Venanzi, L. Klein, Z. Chen, S. P. Berzins, S. J. Turley, H. von Boehmer, R. Bronson, A. Dierich, C. Benoist, and D. Mathis, "Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein.," *Science*, vol. 298, no. 5597, pp. 1395–1401, 2002.
- [32] L. A. Pobezinsky, G. S. Angelov, X. Tai, S. Jeurling, F. Van Laethem, L. Feigenbaum, J.-H. Park, and A. Singer, "Clonal deletion and the fate of autoreactive thymocytes that survive negative selection.," *Nat. Immunol.*, vol. 13, no. 6, pp. 569–78, Jun. 2012.
- [33] G. Schönrich, F. Momburg, G. J. Hämmerling, and B. Arnold, "Anergy induced by thymic medullary epithelium.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 22, no. 7, pp. 1687–91, Jul. 1992.
- [34] A. M. Gallegos and M. J. Bevan, "Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation.," *J. Exp. Med.*, vol. 200, no. 8, pp. 1039–49, Oct. 2004.
- [35] F.-X. Hubert, S. A. Kinkel, G. M. Davey, B. Phipson, S. N. Mueller, A. Liston, A. I. Proietto, P. Z. F. Cannon, S. Forehan, G. K. Smyth, L. Wu, C. C. Goodnow, F. R. Carbone, H. S. Scott, and W. R. Heath, "Aire regulates the transfer of antigen from mTECs to dendritic cells for induction of thymic tolerance.," *Blood*, vol. 118, no. 9, pp. 2462–72, Sep. 2011.
- [36] Y. Lei, A. M. Ripen, N. Ishimaru, I. Ohigashi, T. Nagasawa, L. T. Jeker, M. R. Bösl, G. A. Holländer, Y. Hayashi, R. de W. Malefyt, T. Nitta, and Y. Takahama, "Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development.," *J. Exp. Med.*, vol. 208, no. 2, pp. 383–94, Feb. 2011.
-

-
- [37] C. C. Picca, J. Larkin, A. Boesteanu, M. a. Lerman, A. L. Rankin, and A. J. Caton, "Role of TCR specificity in CD4+CD25+ regulatory T-cell selection," *Immunol. Rev.*, vol. 212, pp. 74–85, 2006.
- [38] M. Hinterberger, M. Aichinger, O. Prazeres da Costa, D. Voehringer, R. Hoffmann, and L. Klein, "Autonomous role of medullary thymic epithelial cells in central CD4(+) T cell tolerance.," *Nat. Immunol.*, vol. 11, no. 6, pp. 512–9, Jun. 2010.
- [39] K. a Hogquist, T. a Baldwin, and S. C. Jameson, "Central tolerance: learning self-control in the thymus.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 5, pp. 772–782, 2005.
- [40] C. Bouneaud, P. Kourilsky, and P. Bousso, "Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion.," *Immunity*, vol. 13, no. 6, pp. 829–40, Dec. 2000.
- [41] G. Y. Liu, P. J. Fairchild, R. M. Smith, J. R. Prowle, D. Kioussis, and D. C. Wraith, "Low avidity recognition of self-antigen by T cells permits escape from central tolerance," *Immunity*, vol. 3, no. 4, pp. 407–415, Oct. 1995.
- [42] B. O. Roep, M. A. Atkinson, P. M. van Endert, P. A. Gottlieb, S. B. Wilson, and J. A. Sachs, "Autoreactive T cell responses in insulin-dependent (Type 1) diabetes mellitus. Report of the first international workshop for standardization of T cell assays.," *J. Autoimmun.*, vol. 13, no. 2, pp. 267–82, Sep. 1999.
- [43] T. Lohmann, R. D. Leslie, and M. Londei, "T cell clones to epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 raised from normal subjects and patients with insulin-dependent diabetes.," *J. Autoimmun.*, vol. 9, no. 3, pp. 385–9, Jun. 1996.
- [44] K. Ota, M. Matsui, E. L. Milford, G. A. Mackin, H. L. Weiner, and D. A. Hafler, "T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis.," *Nature*, vol. 346, no. 6280, pp. 183–7, Jul. 1990.
- [45] S. Markovic-Plese, H. Fukaura, J. Zhang, A. al-Sabbagh, S. Southwood, A. Sette, V. K. Kuchroo, and D. A. Hafler, "T cell recognition of immunodominant and cryptic proteolipid protein epitopes in humans.," *J. Immunol.*, vol. 155, no. 2, pp. 982–92, Jul. 1995.
- [46] C. Kurts, R. M. Sutherland, G. Davey, M. Li, A. M. Lew, E. Blanas, F. R. Carbone, J. F. Miller, and W. R. Heath, "CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 22, pp. 12703–7, Oct. 1999.
- [47] R. R. Caspi, "Ocular autoimmunity: the price of privilege?," *Immunol. Rev.*, vol. 213, pp. 23–35, Oct. 2006.
- [48] S. K. Bromley, D. a Peterson, M. D. Gunn, and M. L. Dustin, "Cutting edge: hierarchy of chemokine receptor and TCR signals regulating T cell migration and proliferation.," *J. Immunol.*, vol. 165, no. 1, pp. 15–19, 2000.
-

-
- [49] M. Y. Gerner and M. F. Mescher, "Antigen processing and MHC-II presentation by dermal and tumor-infiltrating dendritic cells.," *J. Immunol.*, vol. 182, no. 5, pp. 2726–37, Mar. 2009.
- [50] P. S. Ohashi, S. Oehen, K. Buerki, H. Pircher, C. T. Ohashi, B. Odermatt, B. Malissen, R. M. Zinkernagel, and H. Hengartner, "Ablation of 'tolerance' and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice," *Cell*, vol. 65, no. 2, pp. 305–317, Apr. 1991.
- [51] P. Arck, M. E. Solano, M. Walecki, and A. Meinhardt, "The immune privilege of testis and gravid uterus: same difference?," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 382, no. 1, pp. 509–20, Jan. 2014.
- [52] I. a Parish and W. R. Heath, "Too dangerous to ignore: self-tolerance and the control of ignorant autoreactive T cells.," *Immunol. Cell Biol.*, vol. 86, no. 2, pp. 146–152, 2008.
- [53] Ronald H. Schwartz, "T CELL ANERGY," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 20, no. 1, pp. 761–794, 2002.
- [54] M. K. Jenkins and R. H. Schwartz, "Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo.," *J. Exp. Med.*, vol. 165, no. 2, pp. 302–19, Feb. 1987.
- [55] J. D. Powell, "The induction and maintenance of T cell anergy.," *Clin. Immunol.*, vol. 120, no. 3, pp. 239–46, Sep. 2006.
- [56] B. Beverly, S. M. Kang, M. J. Lenardo, and R. H. Schwartz, "Reversal of in vitro T cell clonal anergy by IL-2 stimulation.," *Int. Immunol.*, vol. 4, no. 6, pp. 661–71, Jun. 1992.
- [57] K. Pletinckx, M. Vaeth, T. Schneider, N. Beyersdorf, T. Hünig, F. Berberich-Siebelt, and M. B. Lutz, "Immature dendritic cells convert anergic nonregulatory T cells into Foxp3- IL-10+ regulatory T cells by engaging CD28 and CTLA-4.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 45, no. 2, pp. 480–91, Feb. 2015.
- [58] T. R. Mosmann, H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin, and R. L. Coffman, "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.," *J. Immunol.*, vol. 136, no. 7, pp. 2348–57, Apr. 1986.
- [59] K. Hirahara, A. Poholek, G. Vahedi, A. Laurence, Y. Kanno, J. D. Milner, and J. J. O'Shea, "Mechanisms underlying helper T-cell plasticity: implications for immune-mediated disease.," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 131, no. 5, pp. 1276–87, May 2013.
- [60] S. C. Liang, X.-Y. Tan, D. P. Luxenberg, R. Karim, K. Dunussi-Joannopoulos, M. Collins, and L. A. Fouser, "Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides.," *J. Exp. Med.*, vol. 203, no. 10, pp. 2271–9, Oct. 2006.

-
- [61] J. Verhagen, A. Wegner, and D. C. Wraith, "Extra-thymically induced T regulatory cell subsets; the optimal target for antigen-specific immunotherapy," *Immunology*, p. n/a–n/a, 2015.
- [62] S. L. Bailey-Bucktrout, M. Martinez-Llordella, X. Zhou, B. Anthony, W. Rosenthal, H. Luche, H. J. Fehling, and J. A. Bluestone, "Self-antigen-driven activation induces instability of regulatory T cells during an inflammatory autoimmune response.," *Immunity*, vol. 39, no. 5, pp. 949–62, Nov. 2013.
- [63] I. Raphael and T. G. Forsthuber, "Stability of T-cell lineages in autoimmune diseases.," *Expert Rev. Clin. Immunol.*, vol. 8, no. 4, pp. 299–301, May 2012.
- [64] D. A. Young, L. D. Lowe, S. S. Booth, M. J. Whitters, L. Nicholson, V. K. Kuchroo, and M. Collins, "IL-4, IL-10, IL-13, and TGF-beta from an altered peptide ligand-specific Th2 cell clone down-regulate adoptive transfer of experimental autoimmune encephalomyelitis.," *J. Immunol.*, vol. 164, no. 7, pp. 3563–72, Apr. 2000.
- [65] L. M. Bradley, V. C. Asensio, L. K. Schioetz, J. Harbertson, T. Krahl, G. Patstone, N. Woolf, I. L. Campbell, and N. Sarvetnick, "Islet-specific Th1, but not Th2, cells secrete multiple chemokines and promote rapid induction of autoimmune diabetes.," *J. Immunol.*, vol. 162, no. 5, pp. 2511–20, Mar. 1999.
- [66] S. Arif, T. I. Tree, T. P. Astill, J. M. Tremble, A. J. Bishop, C. M. Dayan, B. O. Roep, and M. Peakman, "Autoreactive T cell responses show," *J. Clin. Invest.*, vol. 113, no. 3, pp. 451–463, 2004.
- [67] J. Zhang, X. Xu, and Y. Liu, "Activation-induced cell death in T cells and autoimmunity.," *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 1, no. 3, pp. 186–192, 2004.
- [68] P. Cresswell, "Proteases, processing, and thymic selection.," *Science*, vol. 280, no. 5362, pp. 394–5, Apr. 1998.
- [69] P. M. Allen, "Peptides in positive and negative selection: a delicate balance.," *Cell*, vol. 76, no. 4, pp. 593–6, Feb. 1994.
- [70] D. Kabelitz and O. Janssen, "Antigen-induced death of T-lymphocytes.," *Front. Biosci.*, vol. 2, pp. d61–77, Feb. 1997.
- [71] J. Zhang, J. X. Gao, K. Salojin, Q. Shao, M. Grattan, C. Meagher, D. W. Laird, and T. L. Delovitch, "Regulation of fas ligand expression during activation-induced cell death in T cells by p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH2-terminal kinase.," *J. Exp. Med.*, vol. 191, no. 6, pp. 1017–30, Mar. 2000.
- [72] D. R. Green, N. Droin, and M. Pinkoski, "Activation-induced cell death in T cells.," *Immunol. Rev.*, vol. 193, pp. 70–81, 2003.

-
- [73] F. Rieux-Laucat, F. Le Deist, C. Hivroz, I. A. Roberts, K. M. Debatin, A. Fischer, and J. P. de Villartay, "Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity.," *Science*, vol. 268, no. 5215, pp. 1347–9, Jun. 1995.
- [74] P. Bouillet, D. Metcalf, D. C. Huang, D. M. Tarlinton, T. W. Kay, F. Köntgen, J. M. Adams, and A. Strasser, "Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity.," *Science*, vol. 286, no. 5445, pp. 1735–8, Nov. 1999.
- [75] L. S. K. Walker and A. K. Abbas, "The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 2, no. 1, pp. 11–19, 2002.
- [76] S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda, "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases.," *J. Immunol.*, vol. 155, no. 3, pp. 1151–64, Aug. 1995.
- [77] M. Itoh, T. Takahashi, N. Sakaguchi, Y. Kuniyasu, J. Shimizu, F. Otsuka, and S. Sakaguchi, "Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance.," *J. Immunol.*, vol. 162, no. 9, pp. 5317–26, May 1999.
- [78] C. Pomié, I. Ménager-Marcq, and J. P. M. van Meerwijk, "Murine CD8+ regulatory T lymphocytes: the new era.," *Hum. Immunol.*, vol. 69, no. 11, pp. 708–14, Nov. 2008.
- [79] B. O. Lee, J. E. Jones, C. J. Peters, D. Whitacre, L. Frelin, J. Hughes, W.-K. Kim, and D. R. Milich, "Identification of a unique double-negative regulatory T-cell population.," *Immunology*, vol. 134, no. 4, pp. 434–47, Dec. 2011.
- [80] H. Zeng, R. Zhang, B. Jin, and L. Chen, "Type 1 regulatory T cells: a new mechanism of peripheral immune tolerance.," *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 12, no. 5, pp. 566–71, Sep. 2015.
- [81] D. Chen, N. Zhang, S. Fu, B. Schröppel, Q. Guo, A. Garin, S. A. Lira, and J. S. Bromberg, "CD4+ CD25+ regulatory T-cells inhibit the islet innate immune response and promote islet engraftment.," *Diabetes*, vol. 55, no. 4, pp. 1011–21, Apr. 2006.
- [82] D. K. Sojka, Y. H. Huang, and D. J. Fowell, "Mechanisms of regulatory T-cell suppression - A diverse arsenal for a moving target," *Immunology*, vol. 124, no. 1, pp. 13–22, 2008.
- [83] K. Wing, Y. Onishi, P. Prieto-Martin, T. Yamaguchi, M. Miyara, Z. Fehervari, T. Nomura, and S. Sakaguchi, "CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function.," *Science*, vol. 322, no. 5899, pp. 271–5, Oct. 2008.
- [84] A. L. Mellor and D. H. Munn, "IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 4, no. 10, pp. 762–774, 2004.
-

-
- [85] D. Homann, A. Holz, A. Bot, B. Coon, T. Wolfe, J. Petersen, T. P. Dyrberg, M. J. Grusby, and M. G. von Herrath, "Autoreactive CD4⁺ T cells protect from autoimmune diabetes via bystander suppression using the IL-4/Stat6 pathway.," *Immunity*, vol. 11, no. 4, pp. 463–72, Oct. 1999.
- [86] D. R. Tonkin, J. He, G. Barbour, and K. Haskins, "Regulatory T cells prevent transfer of type 1 diabetes in NOD mice only when their antigen is present in vivo.," *J. Immunol.*, vol. 181, no. 7, pp. 4516–22, Oct. 2008.
- [87] J. M. Gardner, J. J. Devoss, R. S. Friedman, D. J. Wong, X. Ying, X. Zhou, K. P. Johannes, M. a Su, H. Y. Chang, F. Matthew, and M. S. Anderson, "NIH Public Access," *Science (80-.)*, vol. 321, no. 5890, pp. 843–847, 2009.
- [88] J. M. Gardner, T. C. Metzger, E. J. McMahon, B. B. Au-Yeung, A. K. Krawisz, W. Lu, J. D. Price, K. P. Johannes, A. T. Satpathy, K. M. Murphy, K. V Tarbell, A. Weiss, and M. S. Anderson, "Extrathymic Aire-expressing cells are a distinct bone marrow-derived population that induce functional inactivation of CD4⁺ T cells.," *Immunity*, vol. 39, no. 3, pp. 560–72, Sep. 2013.
- [89] S. J. Rouhani, J. D. Eccles, P. Riccardi, J. D. Peske, E. F. Tewalt, J. N. Cohen, R. Liblau, T. Mäkinen, and V. H. Engelhard, "Roles of lymphatic endothelial cells expressing peripheral tissue antigens in CD4 T-cell tolerance induction," *Nat. Commun.*, vol. 6, p. 6771, 2015.
- [90] K. L. Flannigan, D. Geem, A. Harusato, and T. L. Denning, "Intestinal Antigen-Presenting Cells: Key Regulators of Immune Homeostasis and Inflammation.," *Am. J. Pathol.*, vol. 185, no. 7, pp. 1809–19, May 2015.
- [91] J.-M. Cavaillon, "The historical milestones in the understanding of leukocyte biology initiated by Elie Metchnikoff.," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 90, no. 3, pp. 413–24, Sep. 2011.
- [92] F. Ginhoux and S. Jung, "Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 14, no. 6, pp. 392–404, 2014.
- [93] D. K. Fogg, C. Sibon, C. Miled, S. Jung, P. Aucouturier, D. R. Littman, A. Cumano, and F. Geissmann, "A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells.," *Science*, vol. 311, no. 5757, pp. 83–7, Jan. 2006.
- [94] P. Italiani and D. Boraschi, "New Insights Into Tissue Macrophages: From Their Origin to the Development of Memory," *Immune Netw.*, vol. 15, no. 4, p. 167, Aug. 2015.
- [95] J. M. Austyn and S. Gordon, "F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 11, no. 10, pp. 805–15, Oct. 1981.
- [96] C. D. Dijkstra, E. Van Vliet, E. A. Döpp, A. A. van der Lelij, and G. Kraal, "Marginal zone macrophages identified by a monoclonal antibody: characterization of immuno-

-
- and enzyme-histochemical properties and functional capacities.,” *Immunology*, vol. 55, no. 1, pp. 23–30, May 1985.
- [97] G. Kraal and M. Janse, “Marginal metallophilic cells of the mouse spleen identified by a monoclonal antibody.,” *Immunology*, vol. 58, no. 4, pp. 665–9, Aug. 1986.
- [98] L. C. Davies, S. J. Jenkins, J. E. Allen, and P. R. Taylor, “Tissue-resident macrophages.,” *Nat. Immunol.*, vol. 14, no. 10, pp. 986–95, Oct. 2013.
- [99] P. J. Murray and T. a. Wynn, “Protective and pathogenic functions of macrophage subsets,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 11, no. 11, pp. 723–737, 2011.
- [100] M. Williams, F. Ginhoux, C. Jakubzick, S. H. Naik, N. Onai, B. U. Schraml, E. Segura, R. Tussiwand, and S. Yona, “Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny.,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 14, no. 8, pp. 571–578, 2014.
- [101] T. Hussell and T. J. Bell, “Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context.,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 14, no. 2, pp. 81–93, Feb. 2014.
- [102] F. Geissmann, S. Gordon, D. A. Hume, A. M. Mowat, and G. J. Randolph, “Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity.,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 10, no. 6, pp. 453–60, Jun. 2010.
- [103] C. J. Ferrante and S. J. Leibovich, “Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing.,” *Adv. wound care*, vol. 1, no. 1, pp. 10–16, Feb. 2012.
- [104] I. Malyshev and Y. Malyshev, “Current Concept and Update of the Macrophage Plasticity Concept: Intracellular Mechanisms of Reprogramming and M3 Macrophage ‘Switch’ Phenotype.,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, p. 341308, Jan. 2015.
- [105] S. L. J. Mihnea T. Zdrenghea, Heidi Makrinioti, Adriana Muresan and L. A. Stanciu, “The role of macrophage IL-10/innate IFN interplay during virus-induced asthma,” *Rev. Med. Virol.*, vol. 19, no. 1, pp. 57–64, 2009.
- [106] B. Ravishankar, R. Shinde, H. Liu, K. Chaudhary, J. Bradley, H. P. Lemos, P. Chandler, M. Tanaka, D. H. Munn, A. L. Mellor, and T. L. McGaha, “Marginal zone CD169+ macrophages coordinate apoptotic cell-driven cellular recruitment and tolerance,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 111, no. 11, pp. 4215–4220, 2014.
- [107] S. C. Saunderson, A. C. Dunn, P. R. Crocker, and A. D. McLellan, “CD169 mediates the capture of exosomes in spleen and lymph node,” *Blood*, vol. 123, no. 2, pp. 208–216, 2014.
- [108] C. Oetke, M. C. Vinson, C. Jones, and P. R. Crocker, “Sialoadhesin-deficient mice exhibit subtle changes in B- and T-cell populations and reduced immunoglobulin M levels.,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 26, no. 4, pp. 1549–57, Feb. 2006.

-
- [109] U. Hadis, B. Wahl, O. Schulz, M. Hardtke-Wolenski, A. Schippers, N. Wagner, W. Müller, T. Sparwasser, R. Förster, and O. Pabst, “Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3⁺ regulatory T cells in the lamina propria.,” *Immunity*, vol. 34, no. 2, pp. 237–46, Feb. 2011.
- [110] R. M. Steinman and Z. a Cohn, “Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution.,” *J. Exp. Med.*, vol. 137, no. 5, pp. 1142–1162, 1973.
- [111] M. Merad, P. Sathe, J. Helft, J. Miller, and A. Mortha, “The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting.,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 31, pp. 563–604, 2013.
- [112] J. R. Gordon, Y. Ma, L. Churchman, S. A. Gordon, and W. Dawicki, “Regulatory dendritic cells for immunotherapy in immunologic diseases.,” *Front. Immunol.*, vol. 5, p. 7, Jan. 2014.
- [113] P. Bousso, “T-cell activation by dendritic cells in the lymph node: lessons from the movies.,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 8, no. 9, pp. 675–84, Sep. 2008.
- [114] F. Geissmann, M. G. Manz, S. Jung, M. H. Sieweke, M. Merad, and K. Ley, “Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells.,” *Science*, vol. 327, no. 5966, pp. 656–61, Feb. 2010.
- [115] B. Reizis, A. Bunin, H. S. Ghosh, K. L. Lewis, and V. Sisirak, “Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions.,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 29, pp. 163–83, Jan. 2011.
- [116] K. Shortman and W. R. Heath, “The CD8⁺ dendritic cell subset.,” *Immunol. Rev.*, vol. 234, no. 1, pp. 18–31, Mar. 2010.
- [117] E. Segura, J. Valladeau-Guilemond, M.-H. Donnadieu, X. Sastre-Garau, V. Soumelis, and S. Amigorena, “Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes.,” *J. Exp. Med.*, vol. 209, no. 4, pp. 653–60, Apr. 2012.
- [118] P. M. Domínguez and C. Ardavín, “Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation,” *Immunol. Rev.*, vol. 234, no. 1, pp. 90–104, 2010.
- [119] B. Reizis, “Classical dendritic cells as a unique immune cell lineage.,” *J. Exp. Med.*, vol. 209, no. 6, pp. 1053–6, Jun. 2012.
- [120] M. Dalod, R. Chelbi, B. Malissen, and T. Lawrence, “Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming.,” *EMBO J.*, vol. 33, no. 10, pp. 1104–16, May 2014.

-
- [121] O. Joffre, M. A. Nolte, R. Spörri, and C. R. e Sousa, “Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity,” *Immunol. Rev.*, vol. 227, no. 1, pp. 234–247, Jan. 2009.
- [122] S. Akira, S. Uematsu, and O. Takeuchi, “Pathogen recognition and innate immunity,” *Cell*, vol. 124, no. 4, pp. 783–801, Feb. 2006.
- [123] S. M. Atif, S. Uematsu, S. Akira, and S. J. McSorley, “CD103-CD11b+ dendritic cells regulate the sensitivity of CD4 T-cell responses to bacterial flagellin,” *Mucosal Immunol.*, vol. 7, no. 1, pp. 68–77, Jan. 2014.
- [124] C. Heufler, F. Koch, U. Stanzl, G. Topar, M. Wysocka, G. Trinchieri, A. Enk, R. M. Steinman, N. Romani, and G. Schuler, “Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 26, no. 3, pp. 659–68, Mar. 1996.
- [125] J. Banchereau and R. M. Steinman, “Dendritic cells and the control of immunity,” *Nature*, vol. 392, no. 6673, pp. 245–252, 1998.
- [126] K. C. Howland, L. J. Ausubel, C. A. London, and A. K. Abbas, “The roles of CD28 and CD40 ligand in T cell activation and tolerance,” *J. Immunol.*, vol. 164, no. 9, pp. 4465–70, May 2000.
- [127] R. Rodriguez-Manzanet, R. DeKruyff, V. K. Kuchroo, and D. T. Umetsu, “The costimulatory role of TIM molecules,” *Immunol. Rev.*, vol. 229, no. 1, pp. 259–270, May 2009.
- [128] D. Raïch-Regué, M. Glancy, and A. W. Thomson, “Regulatory dendritic cell therapy: from rodents to clinical application,” *Immunol. Lett.*, vol. 161, no. 2, pp. 216–21, Oct. 2014.
- [129] G. T. Belz, G. M. N. Behrens, C. M. Smith, J. F. A. P. Miller, C. Jones, K. Lejon, C. G. Fathman, S. N. Mueller, K. Shortman, F. R. Carbone, and W. R. Heath, “The CD8 α (+) dendritic cell is responsible for inducing peripheral self-tolerance to tissue-associated antigens,” *J. Exp. Med.*, vol. 196, no. 8, pp. 1099–104, Oct. 2002.
- [130] A. Jiang, O. Bloom, S. Ono, W. Cui, J. Unternaehrer, S. Jiang, J. A. Whitney, J. Connolly, J. Banchereau, and I. Mellman, “Disruption of E-cadherin-mediated adhesion induces a functionally distinct pathway of dendritic cell maturation,” *Immunity*, vol. 27, no. 4, pp. 610–24, Oct. 2007.
- [131] M. Zhang, H. Tang, Z. Guo, H. An, X. Zhu, W. Song, J. Guo, X. Huang, T. Chen, J. Wang, and X. Cao, “Splenic stroma drives mature dendritic cells to differentiate into regulatory dendritic cells,” *Nat. Immunol.*, vol. 5, no. 11, pp. 1124–33, Nov. 2004.
- [132] H. Hackstein and A. W. Thomson, “Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 4, no. 1, pp. 24–34, Jan. 2004.
-

-
- [133] P. Monti, A. Mercalli, B. E. Leone, D. C. Valerio, P. Allavena, and L. Piemonti, "Rapamycin impairs antigen uptake of human dendritic cells.," *Transplantation*, vol. 75, no. 1, pp. 137–45, Jan. 2003.
- [134] L. Piemonti, P. Monti, P. Allavena, M. Sironi, L. Soldini, B. E. Leone, C. Socci, and V. Di Carlo, "Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation.," *J. Immunol.*, vol. 162, no. 11, pp. 6473–81, Jun. 1999.
- [135] O. Akbari, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu, "Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen.," *Nat. Immunol.*, vol. 2, no. 8, pp. 725–31, Aug. 2001.
- [136] K. Sakurai, J.-P. Zou, J. R. Tschetter, J. M. Ward, and G. M. Shearer, "Effect of indoleamine 2,3-dioxygenase on induction of experimental autoimmune encephalomyelitis.," *J. Neuroimmunol.*, vol. 129, no. 1–2, pp. 186–96, Aug. 2002.
- [137] R. M. Steinman, S. Turley, I. Mellman, and K. Inaba, "The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells.," *J. Exp. Med.*, vol. 191, no. 3, pp. 411–6, Feb. 2000.
- [138] R. Kushwah, J. R. Oliver, J. Zhang, K. A. Siminovitch, and J. Hu, "Apoptotic dendritic cells induce tolerance in mice through suppression of dendritic cell maturation and induction of antigen-specific regulatory T cells.," *J. Immunol.*, vol. 183, no. 11, pp. 7104–18, Dec. 2009.
- [139] C. Ohnmacht, A. Pullner, S. B. S. King, I. Drexler, S. Meier, T. Brocker, and D. Voehringer, "Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity.," *J. Exp. Med.*, vol. 206, no. 3, pp. 549–59, Mar. 2009.
- [140] T. Birnberg, L. Bar-On, A. Sapozhnikov, M. L. Caton, L. Cervantes-Barragán, D. Makia, R. Krauthgamer, O. Brenner, B. Ludewig, D. Brockschneider, D. Riethmacher, B. Reizis, and S. Jung, "Lack of conventional dendritic cells is compatible with normal development and T cell homeostasis, but causes myeloid proliferative syndrome.," *Immunity*, vol. 29, no. 6, pp. 986–97, Dec. 2008.
- [141] J. Liu and X. Cao, "Regulatory dendritic cells in autoimmunity: A comprehensive review," *J. Autoimmun.*, pp. 1–12, 2015.
- [142] B. León, M. López-Bravo, and C. Ardavín, "Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*.," *Immunity*, vol. 26, no. 4, pp. 519–31, Apr. 2007.
- [143] M. Greter, J. Helft, A. Chow, D. Hashimoto, A. Mortha, J. Agudo-Cantero, M. Bogunovic, E. L. Gautier, J. Miller, M. Leboeuf, G. Lu, C. Aloman, B. D. Brown, J. W. Pollard, H. Xiong, G. J. Randolph, J. E. Chipuk, P. S. Frenette, and M. Merad, "GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable

-
- for the differentiation of inflammatory dendritic cells.,” *Immunity*, vol. 36, no. 6, pp. 1031–46, Jun. 2012.
- [144] J. R. Aldridge, C. E. Moseley, D. A. Boltz, N. J. Negovetich, C. Reynolds, J. Franks, S. A. Brown, P. C. Doherty, R. G. Webster, and P. G. Thomas, “TNF/iNOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 13, pp. 5306–11, Mar. 2009.
- [145] M. Williams, K. Movahedi, T. Bosschaerts, T. VandenDriessche, M. K. Chuah, M. Hérin, A. Acosta-Sanchez, L. Ma, M. Moser, J. A. Van Ginderachter, L. Brys, P. De Baetselier, and A. Beschin, “IL-10 dampens TNF/inducible nitric oxide synthase-producing dendritic cell-mediated pathogenicity during parasitic infection.,” *J. Immunol.*, vol. 182, no. 2, pp. 1107–18, Jan. 2009.
- [146] M. Plantinga, M. Williams, M. Vanheerswyngheles, K. Deswarte, F. Branco-Madeira, W. Toussaint, L. Vanhoutte, K. Neyt, N. Killeen, B. Malissen, H. Hammad, and B. N. Lambrecht, “Conventional and Monocyte-Derived CD11b+ Dendritic Cells Initiate and Maintain T Helper 2 Cell-Mediated Immunity to House Dust Mite Allergen,” *Immunity*, vol. 38, no. 2, pp. 322–335, 2013.
- [147] H. Nakano, K. L. Lin, M. Yanagita, C. Charbonneau, D. N. Cook, T. Kakiuchi, and M. D. Gunn, “Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses.,” *Nat. Immunol.*, vol. 10, no. 4, pp. 394–402, Apr. 2009.
- [148] F. Sallusto and A. Lanzavecchia, “Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha.,” *J. Exp. Med.*, vol. 179, no. 4, pp. 1109–18, Apr. 1994.
- [149] E. Segura, M. Touzot, A. Bohineust, A. Cappuccio, G. Chiochia, A. Hosmalin, M. Dalod, V. Soumelis, and S. Amigorena, “Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation.,” *Immunity*, vol. 38, no. 2, pp. 336–48, Feb. 2013.
- [150] E. Guttman-Yassky, M. A. Lowes, J. Fuentes-Duculan, J. Whynot, I. Novitskaya, I. Cardinale, A. Haider, A. Khatcherian, J. A. Carucci, R. Bergman, and J. G. Krueger, “Major differences in inflammatory dendritic cells and their products distinguish atopic dermatitis from psoriasis.,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 119, no. 5, pp. 1210–7, May 2007.
- [151] C. Voisine, B. Trinité, and R. Josien, “Les cellules dendritiques,” *Rev. Fr. des Lab.*, vol. 2002, no. 341, pp. 31–42, 2002.
- [152] M. Le Borgne, N. Etchart, A. Goubier, S. A. Lira, J. C. Sirard, N. van Rooijen, C. Caux, S. Ait-Yahia, A. Vicari, D. Kaiserlian, and B. Dubois, “Dendritic cells rapidly recruited into epithelial tissues via CCR6/CCL20 are responsible for CD8+ T cell crosspriming in vivo.,” *Immunity*, vol. 24, no. 2, pp. 191–201, Feb. 2006.

-
- [153] E. Segura, A. L. Albiston, I. P. Wicks, S. Y. Chai, and J. A. Villadangos, "Different cross-presentation pathways in steady-state and inflammatory dendritic cells.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 48, pp. 20377–81, Dec. 2009.
- [154] T. M. Hohl, A. Rivera, L. Lipuma, A. Gallegos, C. Shi, M. Mack, and E. G. Pamer, "Inflammatory Monocytes Facilitate Adaptive CD4 T Cell Responses during Respiratory Fungal Infection," *Cell Host Microbe*, vol. 6, no. 5, pp. 470–481, Nov. 2009.
- [155] L. M. Wakim, J. Waithman, N. van Rooijen, W. R. Heath, and F. R. Carbone, "Dendritic cell-induced memory T cell activation in nonlymphoid tissues.," *Science*, vol. 319, no. 5860, pp. 198–202, Jan. 2008.
- [156] H. Ohyagi, N. Onai, T. Sato, S. Yotsumoto, J. Liu, H. Akiba, H. Yagita, K. Atarashi, K. Honda, A. Roers, W. Müller, K. Kurabayashi, M. Hosoi-Amaike, N. Takahashi, M. Hirokawa, K. Matsushima, K. Sawada, and T. Ohteki, "Monocyte-Derived Dendritic Cells Perform Hemophagocytosis to Fine-Tune Excessive Immune Responses," *Immunity*, vol. 39, no. 3, pp. 584–598, Sep. 2013.
- [157] G. S. Cooper, M. L. K. Bynum, and E. C. Somers, "Recent insights in the epidemiology of autoimmune diseases: improved prevalence estimates and understanding of clustering of diseases.," *J. Autoimmun.*, vol. 33, no. 3–4, pp. 197–207, Jan. 2009.
- [158] J. Ermann and C. G. Fathman, "Autoimmune diseases: genes, bugs and failed regulation.," *Nat. Immunol.*, vol. 2, no. 9, pp. 759–761, 2001.
- [159] H. S. Kahn, T. M. Morgan, L. D. Case, D. Dabelea, E. J. Mayer-Davis, J. M. Lawrence, S. M. Marcovina, and G. Imperatore, "Association of type 1 diabetes with month of birth among U.S. youth: The SEARCH for Diabetes in Youth Study.," *Diabetes Care*, vol. 32, no. 11, pp. 2010–5, Nov. 2009.
- [160] M. Kukko, T. Kimpimäki, S. Korhonen, A. Kupila, S. Simell, R. Veijola, T. Simell, J. Ilonen, O. Simell, and M. Knip, "Dynamics of diabetes-associated autoantibodies in young children with human leukocyte antigen-conferred risk of type 1 diabetes recruited from the general population.," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 90, no. 5, pp. 2712–7, May 2005.
- [161] M. Knip and S. M. Virtanen, "Infant feeding and the risk of type 1 diabetes 1–4," vol. 22, pp. 1506–1513, 2010.
- [162] B. P. Boerner and N. E. Sarvetnick, "Type 1 diabetes: role of intestinal microbiome in humans and mice.," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1243, pp. 103–18, Dec. 2011.
- [163] W.-C. G. Yeung, W. D. Rawlinson, and M. E. Craig, "Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies.," *BMJ*, vol. 342, no. May, p. d35, 2011.
-

-
- [164] H. Erlich, A. M. Valdes, J. Noble, J. A. Carlson, M. Varney, P. Concannon, J. C. Mychaleckyj, J. A. Todd, P. Bonella, A. L. Fear, E. Lavant, A. Louey, and P. Moonsamy, "HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families.," *Diabetes*, vol. 57, no. 4, pp. 1084–92, Apr. 2008.
- [165] D. Dabelea, "The accelerating epidemic of childhood diabetes.," *Lancet (London, England)*, vol. 373, no. 9680, pp. 1999–2000, Jun. 2009.
- [166] W. M. Ridgway, L. B. Peterson, J. A. Todd, D. B. Rainbow, B. Healy, O. S. Burren, and L. S. Wicker, "Gene-gene interactions in the NOD mouse model of type 1 diabetes.," *Adv. Immunol.*, vol. 100, pp. 151–75, Jan. 2008.
- [167] M. von Herrath, "Can we learn from viruses how to prevent type 1 diabetes?: the role of viral infections in the pathogenesis of type 1 diabetes and the development of novel combination therapies.," *Diabetes*, vol. 58, no. 1, pp. 2–11, Jan. 2009.
- [168] D. L. Eizirik, M. Sammeth, T. Bouckenoghe, G. Bottu, G. Sisino, M. Igoillo-Esteve, F. Ortis, I. Santin, M. L. Colli, J. Barthson, L. Bouwens, L. Hughes, L. Gregory, G. Lunter, L. Marselli, P. Marchetti, M. I. McCarthy, and M. Cnop, "The human pancreatic islet transcriptome: expression of candidate genes for type 1 diabetes and the impact of pro-inflammatory cytokines.," *PLoS Genet.*, vol. 8, no. 3, p. e1002552, Jan. 2012.
- [169] T. O. M. L. V. a N. Belle, K. E. N. T. Coppieters, and M. G. V. O. N. Herrath, "Type 1 Diabetes : Etiology , Immunology , and Therapeutic Strategies," pp. 79–118, 2011.
- [170] K. L. Graham, R. M. Sutherland, S. I. Mannering, Y. Zhao, J. Chee, B. Krishnamurthy, H. E. Thomas, A. M. Lew, and T. W. H. Kay, "Pathogenic mechanisms in type 1 diabetes: the islet is both target and driver of disease.," *Rev. Diabet. Stud.*, vol. 9, no. 4, pp. 148–68, Jan. 2012.
- [171] S. Prasad, A. P. Kohm, J. S. McMahon, X. Luo, and S. D. Miller, "Pathogenesis of NOD diabetes is initiated by reactivity to the insulin B chain 9-23 epitope and involves functional epitope spreading.," *J. Autoimmun.*, vol. 39, no. 4, pp. 347–53, Dec. 2012.
- [172] A. Willcox, S. J. Richardson, A. J. Bone, A. K. Foulis, and N. G. Morgan, "Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes.," *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 155, no. 2, pp. 173–81, Feb. 2009.
- [173] E. Martinuzzi, G. Novelli, M. Scotto, P. Blancou, J.-M. Bach, L. Chaillous, G. Bruno, L. Chatenoud, P. van Endert, and R. Mallone, "The frequency and immunodominance of islet-specific CD8+ T-cell responses change after type 1 diabetes diagnosis and treatment.," *Diabetes*, vol. 57, no. 5, pp. 1312–20, May 2008.
- [174] L. S. Wicker, E. H. Leiter, J. A. Todd, R. J. Renjilian, E. Peterson, P. A. Fischer, P. L. Podolin, M. Zijlstra, R. Jaenisch, and L. B. Peterson, "Beta 2-microglobulin-deficient

-
- NOD mice do not develop insulinitis or diabetes.," *Diabetes*, vol. 43, no. 3, pp. 500–4, Mar. 1994.
- [175] S. Lindley, C. M. Dayan, A. Bishop, B. O. Roep, M. Peakman, and T. I. M. Tree, "Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes.," *Diabetes*, vol. 54, no. 1, pp. 92–9, Jan. 2005.
- [176] K. Attridge, C. J. Wang, L. Wardzinski, R. Kenefeck, J. L. Chamberlain, C. Manzotti, M. Kopf, and L. S. K. Walker, "IL-21 inhibits T cell IL-2 production and impairs Treg homeostasis.," *Blood*, vol. 119, no. 20, pp. 4656–64, May 2012.
- [177] P. A. Morel, "Dendritic Cell Subsets in Type 1 Diabetes: Friend or Foe?," *Front. Immunol.*, vol. 4, p. 415, Jan. 2013.
- [178] B. Wootla, M. Eriguchi, and M. Rodriguez, "Is multiple sclerosis an autoimmune disease?," *Autoimmune Dis.*, vol. 1, no. 1, 2012.
- [179] A. H. Beecham, N. A. Patsopoulos, D. K. Xifara, M. F. Davis, A. Kempainen, C. Cotsapas, T. S. Shah, C. Spencer, D. Booth, A. Goris, A. Oturai, J. Saarela, B. Fontaine, B. Hemmer, C. Martin, F. Zipp, S. D'Alfonso, F. Martinelli-Boneschi, B. Taylor, H. F. Harbo, I. Kockum, J. Hillert, T. Olsson, M. Ban, J. R. Oksenberg, R. Hintzen, L. F. Barcellos, C. Agliardi, L. Alfredsson, M. Alizadeh, C. Anderson, R. Andrews, H. B. Søndergaard, A. Baker, G. Band, S. E. Baranzini, N. Barizzone, J. Barrett, C. Bellenguez, L. Bergamaschi, L. Bernardinelli, A. Berthele, V. Biberacher, T. M. C. Binder, H. Blackburn, I. L. Bomfim, P. Brambilla, S. Broadley, B. Brochet, L. Brundin, D. Buck, H. Butzkueven, S. J. Caillier, W. Camu, W. Carpentier, P. Cavalla, E. G. Celius, I. Coman, G. Comi, L. Corrado, L. Cosemans, I. Cournu-Rebeix, B. A. C. Cree, D. Cusi, V. Damotte, G. Defer, S. R. Delgado, P. Deloukas, A. di Sapio, A. T. Dilthey, P. Donnelly, B. Dubois, M. Duddy, S. Eddins, I. Elovaara, F. Esposito, N. Evangelou, B. Fiddes, J. Field, A. Franke, C. Freeman, I. Y. Frohlich, D. Galimberti, C. Gieger, P.-A. Gourraud, C. Graetz, A. Graham, V. Grummel, C. Guaschino, A. Hadjixenofontos, H. Hakonarson, C. Halfpenny, G. Hall, P. Hall, A. Hamsten, J. Harley, T. Harrower, C. Hawkins, G. Hellenthal, C. Hillier, J. Hobart, M. Hoshi, S. E. Hunt, M. Jagodic, I. Jelčić, A. Jochim, B. Kendall, A. Kermode, T. Kilpatrick, K. Koivisto, I. Konidari, T. Korn, H. Kronsbein, C. Langford, M. Larsson, M. Lathrop, C. Lebrun-Frenay, J. Lechner-Scott, M. H. Lee, M. A. Leone, V. Leppä, G. Liberatore, B. A. Lie, C. M. Lill, M. Lindén, J. Link, F. Luessi, J. Lycke, F. Macciardi, S. Männistö, C. P. Manrique, R. Martin, V. Martinelli, D. Mason, G. Mazibrada, C. McCabe, I.-L. Mero, J. Mescheriakova, L. Moutsianas, K.-M. Myhr, G. Nagels, R. Nicholas, P. Nilsson, F. Piehl, M. Pirinen, S. E. Price, H. Quach, M. Reunanen, W. Robberecht, N. P. Robertson, M. Rodegher, D. Rog, M. Salvetti, N. C. Schnetz-Boutaud, F. Sellebjerg, R. C. Selter, C. Schaefer, S. Shaunak, L. Shen, S. Shields, V. Siffrin, M. Slee, P. S. Sorensen, M. Sorosina, M. Sospedra, A. Spurkland, A. Strange, E. Sundqvist, V. Thijs, J. Thorpe, A. Ticca, P. Tienari, C. van Duijn, E. M. Visser, S. Vucic, H. Westerlind, J. S. Wiley, A. Wilkins, J. F. Wilson, J. Winkelmann, J. Zajicek, E. Zindler, J. L. Haines, M. A. Pericak-Vance, A. J. Iverson, G. Stewart, D. Hafler, S. L. Hauser, A. Compston, G. McVean, P. De Jager, S. J. Sawcer, and J. L. McCauley, "Analysis of immune-
-

-
- related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis.," *Nat. Genet.*, vol. 45, no. 11, pp. 1353–60, Nov. 2013.
- [180] P. Kivisäkk, D. J. Mahad, M. K. Callahan, C. Trebst, B. Tucky, T. Wei, L. Wu, E. S. Baekkevold, H. Lassmann, S. M. Staugaitis, J. J. Campbell, and R. M. Ransohoff, "Human cerebrospinal fluid central memory CD4⁺ T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 14, pp. 8389–94, Jul. 2003.
- [181] A. Louveau, I. Smirnov, T. J. Keyes, J. D. Eccles, S. J. Rouhani, J. D. Peske, N. C. Derecki, D. Castle, J. W. Mandell, K. S. Lee, T. H. Harris, and J. Kipnis, "Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels," *Nature*, vol. 523, no. 7560, pp. 337–41, Jun. 2015.
- [182] S. S. Zamvil, D. J. Mitchell, A. C. Moore, K. Kitamura, L. Steinman, and J. B. Rothbard, "T-cell epitope of the autoantigen myelin basic protein that induces encephalomyelitis.," *Nature*, vol. 324, no. 6094, pp. 258–60, Jan. .
- [183] A. Ben-Nun, H. Wekerle, and I. R. Cohen, "The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 11, no. 3, pp. 195–9, Mar. 1981.
- [184] J. R. Lees, P. T. Golumbek, J. Sim, D. Dorsey, and J. H. Russell, "Regional CNS responses to IFN-gamma determine lesion localization patterns during EAE pathogenesis.," *J. Exp. Med.*, vol. 205, no. 11, pp. 2633–42, Oct. 2008.
- [185] M. A. Kroenke, T. J. Carlson, A. V Andjelkovic, and B. M. Segal, "IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition.," *J. Exp. Med.*, vol. 205, no. 7, pp. 1535–41, Jul. 2008.
- [186] A. Reboldi, C. Coisne, D. Baumjohann, F. Benvenuto, D. Bottinelli, S. Lira, A. Uccelli, A. Lanzavecchia, B. Engelhardt, and F. Sallusto, "C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE.," *Nat. Immunol.*, vol. 10, no. 5, pp. 514–23, May 2009.
- [187] B. Ajami, J. L. Bennett, C. Krieger, K. M. McNagny, and F. M. V Rossi, "Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool.," *Nat. Neurosci.*, vol. 14, no. 9, pp. 1142–9, Sep. 2011.
- [188] F. L. Heppner, M. Greter, D. Marino, J. Falsig, G. Raivich, N. Hövelmeyer, A. Waisman, T. Rülcke, M. Prinz, J. Priller, B. Becher, and A. Aguzzi, "Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis.," *Nat. Med.*, vol. 11, no. 2, pp. 146–52, Mar. 2005.
- [189] E. C. Lallana and C. E. Fadul, "Toxicities of immunosuppressive treatment of autoimmune neurologic diseases.," *Curr. Neuropharmacol.*, vol. 9, no. 3, pp. 468–77, Sep. 2011.
-

-
- [190] J. a Bluestone, "Regulatory T cell therapy: is it ready for the clinic?," *Nat. Immunol.*, vol. 32, no. 7, pp. 301–6, 2005.
- [191] A. C. Chan and P. J. Carter, "Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 10, no. 5, pp. 301–316, 2010.
- [192] D. J. Lenschow, S. C. Ho, H. Sattar, L. Rhee, G. Gray, N. Nabavi, K. C. Herold, and J. A. Bluestone, "Differential effects of anti-B7-1 and anti-B7-2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse.," *J. Exp. Med.*, vol. 181, no. 3, pp. 1145–55, Mar. 1995.
- [193] T. T. Hansel, H. Kropshofer, T. Singer, J. a Mitchell, and A. J. T. George, "The safety and side effects of monoclonal antibodies.," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 9, no. 4, pp. 325–338, 2010.
- [194] S. D. Miller, D. M. Turley, and J. R. Podojil, "Antigen-specific tolerance strategies for the prevention and treatment of autoimmune disease.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 7, no. August, pp. 665–677, 2007.
- [195] a Gaur, B. Wiers, a Liu, J. Rothbard, and C. G. Fathman, "Amelioration of autoimmune encephalomyelitis by myelin basic protein synthetic peptide-induced energy.," *Science*, vol. 258, no. 5087, pp. 1491–1494, 1992.
- [196] B. K. Sack, R. W. Herzog, C. Terhorst, and D. M. Markusic, "Development of gene transfer for induction of antigen-specific tolerance," *Mol. Ther. — Methods Clin. Dev.*, vol. 1, no. February, p. 14013, 2014.
- [197] B. Y. M. K. Jenkins and R. H. Schwartz, "ANTIGEN PRESENTATION BY CHEMICALLY MODIFIED SPLENOCYTES INDUCES ANTIGEN-SPECIFIC T CELL UNRESPONSIVENESS IN VITRO AND IN VIVO Despite a large body of evidence concerning the phenomenon of immune tolerance at the T cell level , the actual mechanism of unre," vol. 165, no. February, 1987.
- [198] R. a. Maldonado, R. a. LaMothe, J. D. Ferrari, A.-H. Zhang, R. J. Rossi, P. N. Kolte, A. P. Griset, C. O'Neil, D. H. Altreuter, E. Browning, L. Johnston, O. C. Farokhzad, R. Langer, D. W. Scott, U. H. von Andrian, and T. K. Kishimoto, "Polymeric synthetic nanoparticles for the induction of antigen-specific immunological tolerance," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, no. 2, pp. E156–E165, 2015.
- [199] A. Tobler, R. Meier, M. Seitz, B. Dewald, M. Baggiolini, and M. F. Fey, "Glucocorticoids downregulate gene expression of GM-CSF, NAP-1/IL-8, and IL-6, but not of M-CSF in human fibroblasts.," *Blood*, vol. 79, no. 1, pp. 45–51, Jan. 1992.
- [200] A. Kelso and A. Munck, "Glucocorticoid inhibition of lymphokine secretion by alloreactive T lymphocyte clones.," *J. Immunol.*, vol. 133, no. 2, pp. 784–91, Aug. 1984.
- [201] M. Colvin, "Alkylating Agents." BC Decker, 2003.

-
- [202] M. E. Cardenas, D. Zhu, and J. Heitman, "Molecular mechanisms of immunosuppression by cyclosporine, FK506, and rapamycin.," *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, vol. 4, no. 6, pp. 472–7, Nov. 1995.
- [203] G. Köhler and C. Milstein, "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity," *Nature*, vol. 256, no. 5517, pp. 495–497, Aug. 1975.
- [204] R. W. Schroff, K. a Foon, S. M. Beatty, R. K. Oldham, and A. C. Morgan, "Human Anti-Murine Immunoglobulin Responses in Patients Receiving Monoclonal Antibody Therapy Human Anti-Murine Immunoglobulin Responses in Patients Receiving Monoclonal Antibody Therapy1," *Cancer Res.*, vol. 45, no. February, pp. 879–885, 1985.
- [205] P. Chames, M. Van Regenmortel, E. Weiss, and D. Baty, "Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future.," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 157, no. 2, pp. 220–33, May 2009.
- [206] Z. A. Ahmad, S. K. Yeap, A. M. Ali, W. Y. Ho, N. B. M. Alitheen, and M. Hamid, "scFv antibody: principles and clinical application.," *Clin. Dev. Immunol.*, vol. 2012, p. 980250, Jan. 2012.
- [207] A. B. Cosimi, R. B. Colvin, R. C. Burton, R. H. Rubin, G. Goldstein, P. C. Kung, W. P. Hansen, F. L. Delmonico, and P. S. Russell, "Use of monoclonal antibodies to T-cell subsets for immunologic monitoring and treatment in recipients of renal allografts.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 305, no. 6, pp. 308–14, Aug. 1981.
- [208] K. C. Herold, W. Hagopian, J. A. Auger, E. Poumian-Ruiz, L. Taylor, D. Donaldson, S. E. Gitelman, D. M. Harlan, D. Xu, R. A. Zivin, and J. Bluestone, "Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 347, no. 14, pp. 1116–1117; author reply 1116–1117, 2002.
- [209] J. C. W. Edwards, L. Szczepanski, J. Szechinski, A. Filipowicz-Sosnowska, P. Emery, D. R. Close, R. M. Stevens, and T. Shaw, "Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 350, no. 25, pp. 2572–2581, 2004.
- [210] T. A. Yednock, C. Cannon, L. C. Fritz, F. Sanchez-Madrid, L. Steinman, and N. Karin, "Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin.," *Nature*, vol. 356, no. 6364, pp. 63–6, Mar. 1992.
- [211] B. a Wills, N. M. Dung, H. T. Loan, D. T. H. Tam, T. T. N. Thuy, L. T. T. Minh, T. V. Diet, N. T. Hao, N. V. Chau, K. Stepniewska, N. J. White, and J. J. Farrar, "New England Journal," *World Health*, pp. 877–889, 2005.
- [212] J. S. Smolen, A. Beaulieu, A. Rubbert-Roth, C. Ramos-Remus, J. Rovensky, E. Alecock, T. Woodworth, and R. Alten, "Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomised trial," *Lancet*, vol. 371, no. 9617, pp. 987–997, 2008.

-
- [213] F. Haspot, C. Séveno, A.-S. Dugast, F. Coulon, K. Renaudin, C. Usal, M. Hill, I. Anegon, M. Heslan, R. Josien, S. Brouard, J.-P. Soulillou, and B. Vanhove, “Anti-CD28 antibody-induced kidney allograft tolerance related to tryptophan degradation and TCR class II B7 regulatory cells.,” *Am. J. Transplant*, vol. 5, no. 10, pp. 2339–48, Oct. 2005.
- [214] I. Ordás, D. R. Mould, B. G. Feagan, and W. J. Sandborn, “Anti-TNF Monoclonal Antibodies in Inflammatory Bowel Disease: Pharmacokinetics-Based Dosing Paradigms,” *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 91, no. 4, pp. 635–646, Feb. 2012.
- [215] D. M. Bitar and C. C. Whitacre, “Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by the oral administration of myelin basic protein.,” *Cell. Immunol.*, vol. 112, no. 2, pp. 364–370, 1988.
- [216] J. M. Critchfield, M. K. Racke, J. C. Zúñiga-Pflücker, B. Cannella, C. S. Raine, J. Goverman, and M. J. Lenardo, “T cell deletion in high antigen dose therapy of autoimmune encephalomyelitis.,” *Science*, vol. 263, no. 5150, pp. 1139–1143, 1994.
- [217] D. Daniel and D. R. Wegmann, “Intranasal administration of insulin peptide B: 9-23 protects NOD mice from diabetes.,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 778, no. January, pp. 371–372, 1996.
- [218] C. P. Genain, K. Abel, N. Belmar, F. Villinger, D. P. Rosenberg, C. Linington, C. S. Raine, and S. L. Hauser, “Late complications of immune deviation therapy in a nonhuman primate.,” *Science*, vol. 274, no. 5295, pp. 2054–2057, 1996.
- [219] Y. Chen, V. K. Kuchroo, J. Inobe, D. a Hafler, and H. L. Weiner, “Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis.,” *Science*, vol. 265, no. 5176, pp. 1237–1240, 1994.
- [220] J. S. Skyler, J. P. Krischer, J. Wolfsdorf, C. Cowie, J. P. Palmer, C. Greenbaum, D. Cuthbertson, L. E. Rafkin-Mervis, H. P. Chase, and E. Leschek, “Effects of oral insulin in relatives of patients with type 1 diabetes: The Diabetes Prevention Trial--Type 1.,” *Diabetes Care*, vol. 28, no. 5, pp. 1068–1076, 2005.
- [221] G. Comi, V. Martinelli, M. Rodegher, L. Moiola, O. Bajenaru, A. Carra, I. Elovaara, F. Fazekas, H. P. Hartung, J. Hillert, J. King, S. Komoly, C. Lubetzki, X. Montalban, K. M. Myhr, M. Ravnborg, P. Rieckmann, D. Wynn, C. Young, and M. Filippi, “Effect of glatiramer acetate on conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndrome (PreCISE study): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial.,” *Lancet (London, England)*, vol. 374, no. 9700, pp. 1503–11, Oct. 2009.
- [222] B. Bielekova, B. Goodwin, N. Richert, I. Cortese, T. Kondo, G. Afshar, B. Gran, J. Eaton, J. Antel, J. A. Frank, H. F. McFarland, and R. Martin, “Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand.,” *Nat. Med.*, vol. 6, no. 10, pp. 1167–75, Oct. 2000.
-

-
- [223] J. Ludvigsson, "Therapy with GAD in diabetes.," *Diabetes. Metab. Res. Rev.*, vol. 25, no. 4, pp. 307–15, May 2009.
- [224] R. Tisch, X. D. Yang, S. M. Singer, R. S. Liblau, L. Fugger, and H. O. McDevitt, "Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice.," *Nature*, vol. 366, no. 6450, pp. 72–5, Nov. 1993.
- [225] D. L. Kaufman, M. Clare-Salzler, J. Tian, T. Forsthuber, G. S. Ting, P. Robinson, M. A. Atkinson, E. E. Sercarz, A. J. Tobin, and P. V Lehmann, "Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes.," *Nature*, vol. 366, no. 6450, pp. 69–72, Nov. 1993.
- [226] J. Tian, M. A. Atkinson, M. Clare-Salzler, A. Herschenfeld, T. Forsthuber, P. V Lehmann, and D. L. Kaufman, "Nasal administration of glutamate decarboxylase (GAD65) peptides induces Th2 responses and prevents murine insulin-dependent diabetes.," *J. Exp. Med.*, vol. 183, no. 4, pp. 1561–7, Apr. 1996.
- [227] A. E. Morales and K. M. Thrailkill, "GAD-alum immunotherapy in Type 1 diabetes mellitus.," *Immunotherapy*, vol. 3, no. 3, pp. 323–32, Mar. 2011.
- [228] "GAD Treatment and Insulin Secretion in Recent-Onset Type 1 Diabetes — NEJM." [Online]. Available: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa0804328#t=article>. [Accessed: 21-Sep-2015].
- [229] J. Ludvigsson, D. Krisky, R. Casas, T. Battelino, L. Castaño, J. Greening, O. Kordonouri, T. Otonkoski, P. Pozzilli, J.-J. Robert, H. J. Veeze, and J. Palmer, "GAD65 Antigen Therapy in Recently Diagnosed Type 1 Diabetes Mellitus," *N. Engl. J. Med.*, vol. 366, no. 5, pp. 433–442, 2012.
- [230] D. Li, G. Romain, a.-L. Flamar, D. Duluc, M. Dullaers, X.-H. Li, S. Zurawski, N. Bosquet, a. K. Palucka, R. Le Grand, a. O'Garra, G. Zurawski, J. Banchereau, and S. Oh, "Targeting self- and foreign antigens to dendritic cells via DC-ASGPR generates IL-10-producing suppressive CD4⁺ T cells," *J. Exp. Med.*, vol. 209, no. 1, pp. 109–121, 2012.
- [231] S. Lüth, S. Huber, C. Schramm, T. Buch, S. Zander, C. Stadelmann, W. Brück, D. C. Wraith, J. Herkel, and A. W. Lohse, "Ectopic expression of neural autoantigen in mouse liver suppresses experimental autoimmune neuroinflammation by inducing antigen-specific Tregs," *J. Clin. Invest.*, vol. 118, no. 10, pp. 3403–3410, 2008.
- [232] G. Marodon, S. Fisson, B. Levacher, M. Fabre, B. L. Salomon, and D. Klatzmann, "Induction of antigen-specific tolerance by intrathymic injection of lentiviral vectors," *Blood*, vol. 108, no. 9, pp. 2972–2978, 2006.
- [233] B. Xu, P. Haviernik, L. a. Wolfrain, K. D. Bunting, and D. W. Scott, "Bone marrow transplantation combined with gene therapy to induce antigen-specific tolerance and ameliorate EAE," *Mol. Ther.*, vol. 13, no. 1, pp. 42–48, 2006.

-
- [234] M. E. F. Melo, J. Qian, M. El-Amine, R. K. Agarwal, N. Soukhareva, Y. Kang, and D. W. Scott, "Gene transfer of Ig-fusion proteins into B cells prevents and treats autoimmune diseases.," *J. Immunol.*, vol. 168, no. 9, pp. 4788–4795, 2002.
- [235] M. Rothe, A. Schambach, and L. Biasco, "Safety of Gene Therapy: New Insights to a Puzzling Case."
- [236] R. J. DiPaolo, C. Brinster, T. S. Davidson, J. Andersson, D. Glass, and E. M. Shevach, "Autoantigen-specific TGFbeta-induced Foxp3+ regulatory T cells prevent autoimmunity by inhibiting dendritic cells from activating autoreactive T cells.," *J. Immunol.*, vol. 179, no. 7, pp. 4685–93, Oct. 2007.
- [237] R. K. Selvaraj and T. L. Geiger, "Mitigation of experimental allergic encephalomyelitis by TGF-beta induced Foxp3+ regulatory T lymphocytes through the induction of anergy and infectious tolerance.," *J. Immunol.*, vol. 180, no. 5, pp. 2830–8, Mar. 2008.
- [238] E. N. Huter, G. H. Stummvoll, R. J. DiPaolo, D. D. Glass, and E. M. Shevach, "Cutting edge: antigen-specific TGF beta-induced regulatory T cells suppress Th17-mediated autoimmune disease.," *J. Immunol.*, vol. 181, no. 12, pp. 8209–13, Dec. 2008.
- [239] B. Y. S. D. Millers, R. I. C. H. A. R. D. P. Wetzig, and H. N. Claman, "THE INDUCTION OF CELL-MEDIATED IMMUNITY AND TOLERANCE WITH PROTEIN ANTIGENS COUPLED TO SYNGENEIC LYMPHOID CELLS * From The Division of Clinical Immunology , Department of Medicine and The Department of Microbiolo," vol. 149, no. March, pp. 758–773, 1979.
- [240] L. J. Tan, M. K. Kennedy, and S. D. Miller, "Regulation of the effector stages of experimental autoimmune encephalomyelitis via neuroantigen-specific tolerance induction. II. Fine specificity of effector T cell inhibition.," *J. Immunol.*, vol. 148, no. 9, pp. 2748–55, May 1992.
- [241] B. T. Fife, I. Guleria, M. Gubbels Bupp, T. N. Eagar, Q. Tang, H. Bour-Jordan, H. Yagita, M. Azuma, M. H. Sayegh, and J. a Bluestone, "Insulin-induced remission in new-onset NOD mice is maintained by the PD-1-PD-L1 pathway.," *J. Exp. Med.*, vol. 203, no. 12, pp. 2737–2747, 2006.
- [242] A. Lutterotti and S. Yousef, "Antigen-Specific Tolerance by Autologous Myelin Peptide–Coupled Cells: A Phase 1 Trial in Multiple Sclerosis," *Sci. Transl.*, vol. 5, no. 188, pp. 1–21, 2013.
- [243] D. R. Getts, D. P. McCarthy, and S. D. Miller, "Exploiting apoptosis for therapeutic tolerance induction.," *J. Immunol.*, vol. 191, no. 11, pp. 5341–6, 2013.
- [244] M. K. Dennis, A. S. Field, R. Burai, C. Ramesh, K. Whitney, C. G. Bologna, T. I. Oprea, Y. Yamaguchi, S. Hayashi, L. a Sklar, H. J. Hathaway, J. B. Arterburn, and E. R. Prossnitz, "NIH Public Access," vol. 127, no. 5, pp. 358–366, 2012.

-
- [245] W. T. Yap, M. T. Getts, M. Pleiss, and X. Luo, "NIH Public Access," vol. 30, no. 12, pp. 1217–1224, 2013.
- [246] Y. R. Tenhunen and R. Schmid, "The Enzymatic Conversion of Heme to Bilirubin by Microsomal Heme Oxygenase," 1968.
- [247] M. D. Maines, "The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases.," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 37, pp. 517–54, Jan. 1997.
- [248] W. K. McCoubrey, T. J. Huang, and M. D. Maines, "Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3.," *Eur. J. Biochem.*, vol. 247, no. 2, pp. 725–732, 1997.
- [249] S. Doré, M. Takahashi, C. D. Ferris, R. Zakhary, L. D. Hester, D. Guastella, and S. H. Snyder, "Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 5, pp. 2445–2450, 1999.
- [250] M. L. Ferrándiz and I. Devesa, "Inducers of heme oxygenase-1.," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 14, no. 5, pp. 473–486, 2008.
- [251] S. Schulz, R. J. Wong, H. J. Vreman, and D. K. Stevenson, "Metalloporphyrins - An update," *Front. Pharmacol.*, vol. 3 APR, no. April, pp. 1–16, 2012.
- [252] M. P. Soares, Y. Lin, J. Anrather, E. Csizmadia, K. Takigami, K. Sato, S. T. Grey, R. B. Colvin, a M. Choi, K. D. Poss, and F. H. Bach, "Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival.," *Nat. Med.*, vol. 4, no. 9, pp. 1073–1077, 1998.
- [253] G. Kovtunovych, M. A. Eckhaus, M. C. Ghosh, H. Ollivierre-Wilson, and T. A. Rouault, "Dysfunction of the heme recycling system in heme oxygenase 1-deficient mice: effects on macrophage viability and tissue iron distribution.," *Blood*, vol. 116, no. 26, pp. 6054–62, Dec. 2010.
- [254] A. N. Schechter, "Hemoglobin research and the origins of molecular medicine.," *Blood*, vol. 112, no. 10, pp. 3927–38, Nov. 2008.
- [255] J. D. Belcher, J. D. Beckman, G. Balla, J. Balla, and G. Vercellotti, "Heme degradation and vascular injury.," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 12, no. 2, pp. 233–48, Feb. 2010.
- [256] E. Tolosano and F. Altruda, "Hemopexin: Structure, Function, and Regulation," *DNA Cell Biol.*, vol. 21, no. 4, pp. 297–306, Apr. 2002.
- [257] S. Fagoonee, J. Gburek, E. Hirsch, S. Marro, S. K. Moestrup, J. M. Laurberg, E. I. Christensen, L. Silengo, F. Altruda, and E. Tolosano, "Plasma protein haptoglobin modulates renal iron loading.," *Am. J. Pathol.*, vol. 166, no. 4, pp. 973–83, Apr. 2005.

-
- [258] F. Namba, H. Go, J. A. Murphy, P. La, G. Yang, S. Sengupta, A. P. Fernando, M. Yohannes, C. Biswas, S. L. Wehrli, and P. A. Dennerly, "Expression level and subcellular localization of heme oxygenase-1 modulates its cytoprotective properties in response to lung injury: a mouse model.," *PLoS One*, vol. 9, no. 3, p. e90936, Jan. 2014.
- [259] J. W. Kaspar, S. K. Niture, and A. K. Jaiswal, "Nrf2:INrf(Keap1) Signaling in Oxidative Stress," *Stress Int. J. Biol. Stress*, vol. 47, no. 9, pp. 1304–1309, 2009.
- [260] G. F. Vile, S. Basu-Modak, C. Waltner, and R. M. Tyrrell, "Heme oxygenase 1 mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblasts.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 91, no. 7, pp. 2607–2610, 1994.
- [261] S. Turkseven, A. Kruger, C. J. Mingone, P. Kaminski, M. Inaba, L. F. Rodella, S. Ikehara, M. S. Wolin, and N. G. Abraham, "Antioxidant mechanism of heme oxygenase-1 involves an increase in superoxide dismutase and catalase in experimental diabetes.," *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 289, no. 2, pp. H701–H707, 2005.
- [262] R. Gozzelino, V. Jeney, and M. P. Soares, "Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1.," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 50, pp. 323–354, 2010.
- [263] D. Willis, a R. Moore, R. Frederick, and D. a Willoughby, "Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response.," *Nat. Med.*, vol. 2, no. 1, pp. 87–90, 1996.
- [264] R. Tenhunen, H. S. Marver, and R. Schmid, "The enzymatic catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin.," *J. Lab. Clin. Med.*, vol. 75, no. 3, pp. 410–21, Mar. 1970.
- [265] N. G. Abraham, J. C. Nelson, T. Ahmed, G. Konwalinka, and R. D. Levere, "Erythropoietin controls heme metabolic enzymes in normal human bone marrow culture.," *Exp. Hematol.*, vol. 17, no. 8, pp. 908–13, Sep. 1989.
- [266] S. W. Ryter, J. Alam, and A. M. K. Choi, "Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications.," *Physiol. Rev.*, vol. 86, no. 2, pp. 583–650, Apr. 2006.
- [267] C. M. Terry, J. A. Clikeman, J. R. Hoidal, and K. S. Callahan, "TNF-alpha and IL-1alpha induce heme oxygenase-1 via protein kinase C, Ca²⁺, and phospholipase A2 in endothelial cells.," *Am. J. Physiol.*, vol. 276, no. 5 Pt 2, pp. H1493–501, May 1999.
- [268] Y. Naito, T. Takagi, and Y. Higashimura, "Heme oxygenase-1 and anti-inflammatory M2 macrophages," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 564, pp. 83–88, 2014.
- [269] L. M. A. Al-Huseini, H. X. Aw Yeang, J. M. Hamdam, S. Sethu, N. Alhumeed, W. Wong, and J. G. Sathish, "Heme oxygenase-1 regulates dendritic cell function through modulation of p38 MAPK-CREB/ATF1 signaling.," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 23, pp. 16442–51, Jun. 2014.

-
- [270] D. P. Converso, C. Taillé, M. C. Carreras, A. Jaitovich, J. J. Poderoso, and J. Boczkowski, "HO-1 is located in liver mitochondria and modulates mitochondrial heme content and metabolism.," *FASEB J.*, vol. 20, no. 8, pp. 1236–1238, 2006.
- [271] H. P. Kim, X. Wang, F. Galbiati, S. W. Ryter, and A. M. K. Choi, "Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells.," *FASEB J.*, vol. 18, no. 10, pp. 1080–1089, 2004.
- [272] K. Ghoreschi, J. Bruck, C. Kellerer, C. Deng, H. Peng, O. Rothfuss, R. Z. Hussain, a. R. Gocke, a. Respa, I. Glocova, N. Valtcheva, E. Alexander, S. Feil, R. Feil, K. Schulze-Osthoff, R. a. Rupec, a. E. Lovett-Racke, R. Dringen, M. K. Racke, and M. Rocken, "Fumarates improve psoriasis and multiple sclerosis by inducing type II dendritic cells," *J. Exp. Med.*, vol. 208, no. 11, pp. 2291–2303, 2011.
- [273] Q. Lin, S. Weis, G. Yang, Y. H. Weng, R. Helston, K. Rish, A. Smith, J. Bordner, T. Polte, F. Gaunitz, and P. a. Dennery, "Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 28, pp. 20621–20633, 2007.
- [274] R. K. Kutty, G. Kutty, I. R. Rodriguez, G. J. Chader, and B. Wiggert, "Chromosomal localization of the human heme oxygenase genes: heme oxygenase-1 (HMOX1) maps to chromosome 22q12 and heme oxygenase-2 (HMOX2) maps to chromosome 16p13.3.," *Genomics*, vol. 20, no. 3, pp. 513–6, Apr. 1994.
- [275] N. Yamada, M. Yamaya, S. Okinaga, K. Nakayama, K. Sekizawa, S. Shibahara, and H. Sasaki, "Microsatellite Polymorphism in the Heme Oxygenase-1 Gene Promoter Is Associated with Susceptibility to Emphysema," pp. 187–195, 2000.
- [276] K. Ono, T. Mannami, and N. Iwai, "Association of a promoter variant of the haeme oxygenase-1 gene with hypertension in women.," *J. Hypertens.*, vol. 21, no. 8, pp. 1497–503, Aug. 2003.
- [277] S. Takahashi, "Positive and negative regulation of the human heme oxygenase-1 gene expression in cultured cells 1," vol. 1447, pp. 231–235, 1999.
- [278] K. Takedas, S. Ishizawas, M. Satoo, T. Yoshidan, and S. Shibaharalll, "Identification of a & -Acting Element That Is Responsible for Cadmium-mediated Induction of the Human Heme Oxygenase Gene *," vol. 269, no. 36, 1994.
- [279] S. Shibahara, "Structural organization of the human heme oxygenase gene and the function of its promoter," vol. 563, pp. 557–563, 1989.
- [280] M. Exner, G. A. Böhmig, M. Schillinger, H. Regele, B. Watschinger, W. H. Hörl, M. Raith, C. Mannhalter, and O. F. Wagner, "Donor heme oxygenase-1 genotype is associated with renal allograft function.," *Transplantation*, vol. 77, no. 4, pp. 538–42, Feb. 2004.

-
- [281] S. Review and E. Phyllis, "Serial Review : Heme Oxygenase in Human Disease THE ROLE OF HEME OXYGENASE-1 PROMOTER POLYMORPHISMS," vol. 37, no. 8, pp. 1097–1104, 2004.
- [282] C. Rossier, M. Heino, A. Gos, N. Shimizu, S. E. Antonarakis, and H. S. Scott, "Isolation and Characterization of the Mouse," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 490, no. 2, pp. 483–490, 1999.
- [283] S. W. Ryter, J. Alam, and A. M. K. Choi, "Heme Oxygenase-1 / Carbon Monoxide : From Basic Science to Therapeutic Applications," *Physiol Rev*, vol. 86, pp. 583–650, 2006.
- [284] J. Alam and J. L. Cook, "How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene?," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 36, no. 2, pp. 166–174, 2007.
- [285] Y.-S. Keum, "Regulation of Nrf2-Mediated Phase II Detoxification and Anti-oxidant Genes.," *Biomol. Ther. (Seoul).*, vol. 20, no. 2, pp. 144–51, Mar. 2012.
- [286] Y. Lavrovsky, M. L. Schwartzman, R. D. Levere, A. Kappas, and N. G. Abraham, "Identification of binding sites for transcription factors NF-kappa B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 91, no. 13, pp. 5987–5991, Jun. 1994.
- [287] M. Karin, Z. Liu, and E. Zandi, "AP-1 function and regulation," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 9, no. 2, pp. 240–246, Apr. 1997.
- [288] T. H. Lu, Y. Shan, J. Pepe, R. W. Lambrecht, and H. L. Bonkovsky, "Upstream regulatory elements in chick heme oxygenase-1 promoter: a study in primary cultures of chick embryo liver cells.," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 209, no. 1–2, pp. 17–27, 2000.
- [289] N. Wijayanti, S. Huber, A. Samoylenko, T. Kietzmann, and S. Immenschuh, "Role of NF-kappaB and p38 MAP kinase signaling pathways in the lipopolysaccharide-dependent activation of heme oxygenase-1 gene expression.," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 6, no. 5, pp. 802–810, 2004.
- [290] J. Sun, H. Hoshino, K. Takaku, O. Nakajima, A. Muto, H. Suzuki, S. Tashiro, S. Takahashi, S. Shibahara, J. Alam, M. M. Taketo, M. Yamamoto, and K. Igarashi, "Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene," *EMBO J.*, vol. 21, no. 19, pp. 5216–5224, 2002.
- [291] K. Igarashi and J. Sun, "The heme-Bach1 pathway in the regulation of oxidative stress response and erythroid differentiation.," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 8, no. 1–2, pp. 107–18, Jan. .
- [292] A. Prawan, J. K. Kundu, and Y.-J. Surh, "Implications for Chemoprevention and Chemoprotection," vol. 7, 2005.

-
- [293] R. C. Lee, "The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*," *Cell*, vol. 75, pp. 843–854, 1993.
- [294] A. V. Orang, R. Safaralizadeh, and M. Kazemzadeh-bavili, "Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation," *Int. J. Genomics*, vol. 2014, no. June 2013, 2014.
- [295] K. H. Pulkkinen, S. Ylä-Herttuala, and A. L. Levonen, "Heme oxygenase 1 is induced by miR-155 via reduced BACH1 translation in endothelial cells," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 51, no. 11, pp. 2124–2131, 2011.
- [296] J. D. Beckman, C. Chen, J. Nguyen, V. Thayanithy, S. Subramanian, C. J. Steer, and G. M. Vercellotti, "Regulation of heme oxygenase-1 protein expression by miR-377 in Combination with miR-217," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 5, pp. 3194–3202, 2011.
- [297] E. Balogun, M. Hoque, P. Gong, E. Killeen, C. J. Green, R. Foresti, J. Alam, and R. Motterlini, "Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element," *Biochem. J.*, vol. 371, no. Pt 3, pp. 887–95, May 2003.
- [298] M. Álvarez-Maqueda, R. El Bekay, G. Alba, J. Monteseirín, P. Chacón, A. Vega, J. Martín-Nieto, F. J. Bedoya, E. Pintado, and F. Sobrino, "15-Deoxy- Δ 12,14 -prostaglandin J₂ Induces Heme Oxygenase-1 Gene Expression in a Reactive Oxygen Species-dependent Manner in Human Lymphocytes," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 21, pp. 21929–21937, May 2004.
- [299] T. Polte, A. Hemmerle, G. Berndt, N. Grosser, A. Abate, and H. Schröder, "Atrial natriuretic peptide reduces cyclosporin toxicity in renal cells: role of cGMP and heme oxygenase-1," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 32, no. 1, pp. 56–63, Jan. 2002.
- [300] A. K. Kiemer, N. Bildner, N. C. Weber, and A. M. Vollmar, "Characterization of heme oxygenase 1 (heat shock protein 32) induction by atrial natriuretic peptide in human endothelial cells," *Endocrinology*, vol. 144, no. 3, pp. 802–12, Mar. 2003.
- [301] M. K. Sardana and A. Kappas, "Dual control mechanism for heme oxygenase: tin(IV)-protoporphyrin potently inhibits enzyme activity while markedly increasing content of enzyme protein in liver," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 84, no. 8, pp. 2464–8, Apr. 1987.
- [302] M. D. Maines, "Zinc . protoporphyrin is a selective inhibitor of heme oxygenase activity in the neonatal rat," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 673, no. 3, pp. 339–50, Mar. 1981.
- [303] G. S. Drummond and A. Kappas, "The cytochrome P-450-depleted animal: an experimental model for in vivo studies in chemical biology," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 79, no. 7, pp. 2384–8, Apr. 1982.
-

-
- [304] G. S. Drummond and A. Kappas, "Prevention of neonatal hyperbilirubinemia by tin protoporphyrin IX, a potent competitive inhibitor of heme oxidation.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 78, no. 10, pp. 6466–70, Oct. 1981.
- [305] Y. Shan, R. W. Lambrecht, S. E. Donohue, and H. L. Bonkovsky, "Role of Bach1 and Nrf2 in up-regulation of the heme oxygenase-1 gene by cobalt protoporphyrin.," *FASEB J.*, vol. 20, no. 14, pp. 2651–2653, 2006.
- [306] K. D. Poss and S. Tonegawa, "Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, no. 20, pp. 10925–30, Sep. 1997.
- [307] H. Pan, M. He, R. Liu, N. C. Brecha, A. C. H. Yu, and M. Pu, "Sulforaphane Protects Rodent Retinas against Ischemia-Reperfusion Injury through the Activation of the Nrf2/HO-1 Antioxidant Pathway," *PLoS One*, vol. 9, no. 12, p. e114186, 2014.
- [308] N. G. Abraham, Y. Lavrovsky, M. L. Schwartzman, R. a Stoltz, R. D. Levere, M. E. Gerritsen, S. Shibahara, and a Kappas, "Transfection of the human heme oxygenase gene into rabbit coronary microvessel endothelial cells: protective effect against heme and hemoglobin toxicity.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 15, pp. 6798–6802, 1995.
- [309] S. Akatsuka, Y. Yamashita, H. Ohara, Y.-T. Liu, M. Izumiya, K. Abe, M. Ochiai, L. Jiang, H. Nagai, Y. Okazaki, H. Murakami, Y. Sekido, E. Arai, Y. Kanai, O. Hino, T. Takahashi, H. Nakagama, and S. Toyokuni, "Fenton reaction induced cancer in wild type rats recapitulates genomic alterations observed in human cancer.," *PLoS One*, vol. 7, no. 8, p. e43403, Jan. 2012.
- [310] V. Jeney, J. Balla, A. Yachie, Z. Varga, G. M. Vercellotti, J. W. Eaton, and G. Balla, "Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme," *Blood*, vol. 100, no. 3, pp. 879–887, 2002.
- [311] J. Navarro-Yepes, M. Burns, A. Anandhan, O. Khalimonchuk, L. M. del Razo, B. Quintanilla-Vega, A. Pappa, M. I. Panayiotidis, and R. Franco, "Oxidative Stress, Redox Signaling, and Autophagy: Cell Death Versus Survival," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 21, no. 1, pp. 66–85, 2014.
- [312] J. J. Pueyo and C. Gmez-moreno, "Photochemical regeneration of N A D P H using the enzyme ferredoxin- N A D P + reductase," vol. 14, pp. 8–12, 1992.
- [313] M. P. Soares, M. P. Seldon, I. P. Gregoire, T. Vassilevskaia, P. O. Berberat, J. Yu, T.-Y. Tsui, and F. H. Bach, "Heme oxygenase-1 modulates the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation.," *J. Immunol.*, vol. 172, no. 6, pp. 3553–3563, 2004.
- [314] S. Brouard, L. E. Otterbein, J. Anrather, E. Tobiasch, F. H. Bach, a M. Choi, and M. P. Soares, "Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis.," *J. Exp. Med.*, vol. 192, no. 7, pp. 1015–1026, 2000.

-
- [315] G. Silva, A. Cunha, I. P. Gre, M. P. Seldon, and M. P. Soares, "Cells Involved in the Degradation of p38 α MAPK Isoform 1," no. 26, 2006.
- [316] A. Yachie, Y. Niida, T. Wada, N. Igarashi, H. Kaneda, T. Toma, K. Ohta, Y. Kasahara, and S. Koizumi, "Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency.," *J. Clin. Invest.*, vol. 103, no. 1, pp. 129–35, Jan. 1999.
- [317] T.-S. Lee and L.-Y. Chau, "Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice.," *Nat. Med.*, vol. 8, no. 3, pp. 240–6, Mar. 2002.
- [318] L. E. Otterbein, F. H. Bach, J. Alam, M. Soares, H. Tao Lu, M. Wysk, R. J. Davis, R. a Flavell, and a M. Choi, "Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway.," *Nat. Med.*, vol. 6, no. 4, pp. 422–8, Apr. 2000.
- [319] K. Nakahira, H. P. Kim, X. H. Geng, A. Nakao, X. Wang, N. Murase, P. F. Drain, X. Wang, M. Sasidhar, E. G. Nabel, T. Takahashi, N. W. Lukacs, S. W. Ryter, K. Morita, and A. M. K. Choi, "Carbon monoxide differentially inhibits TLR signaling pathways by regulating ROS-induced trafficking of TLRs to lipid rafts.," *J. Exp. Med.*, vol. 203, no. 10, pp. 2377–2389, 2006.
- [320] L. a Mitchell, M. M. Channell, C. M. Royer, S. W. Ryter, A. M. K. Choi, and J. D. McDonald, "Evaluation of inhaled carbon monoxide as an anti-inflammatory therapy in a nonhuman primate model of lung inflammation.," *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 299, no. 6, pp. L891–L897, 2010.
- [321] J. K. Sarady-Andrews, F. Liu, D. Gallo, A. Nakao, M. Overhaus, R. Ollinger, A. M. Choi, and L. E. Otterbein, "Biliverdin administration protects against endotoxin-induced acute lung injury in rats.," *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 289, no. 6, pp. L1131–L1137, 2005.
- [322] S. P. Wilson and S. L. Cassel, "Inflammasome-mediated autoinflammatory disorders.," *Postgrad. Med.*, vol. 122, no. 5, pp. 125–133, 2010.
- [323] Y. P. Luo, L. Jiang, K. Kang, D. S. Fei, X. L. Meng, C. C. Nan, S. H. Pan, M. R. Zhao, and M. Y. Zhao, "Hemin inhibits NLRP3 inflammasome activation in sepsis-induced acute lung injury, involving heme oxygenase-1," *Int. Immunopharmacol.*, vol. 20, no. 1, pp. 24–32, 2014.
- [324] S.-S. Jung, J.-S. Moon, J.-F. Xu, E. Ifedigbo, S. W. Ryter, A. M. K. Choi, and K. Nakahira, "Carbon monoxide negatively regulates NLRP3 inflammasome activation in macrophages.," *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 308, no. 10, pp. L1058–67, May 2015.
- [325] B. Wegiel, R. Larsen, D. Gallo, B. Y. Chin, C. Harris, P. Mannam, E. Kaczmarek, P. J. Lee, B. S. Zuckerbraun, R. Flavell, M. P. Soares, and L. E. Otterbein, "Macrophages sense and kill bacteria through carbon monoxide – dependent inflammasome activation," vol. 124, no. 39, pp. 1–15, 2014.
-

-
- [326] C. W. Matthias H. Kapturczak, M. C.-T. Todd Brusko, A. Tamir M. Ellis,† Mark A. Atkinson, and A. Agarwal*, “Heme Oxygenase-1 Modulates Early Inflammatory Responses,” *Am. J. Pathol.*, vol. 162, no. 1, pp. 343–352, 2004.
- [327] H.-O. Pae, G.-S. Oh, B.-M. Choi, S.-C. Chae, Y.-M. Kim, K.-R. Chung, and H.-T. Chung, “Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation via inhibition of IL-2 production.,” *J. Immunol.*, vol. 172, no. 8, pp. 4744–4751, 2004.
- [328] C. E. Bunse, V. Fortmeier, S. Tischer, E. Zilian, C. Figueiredo, T. Witte, R. Blasczyk, S. Immenschuh, and B. Eiz-Vesper, “Modulation of heme oxygenase-1 by metalloporphyrins increases anti-viral T cell responses.,” *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 179, no. 2, pp. 265–76, Feb. 2015.
- [329] B.-M. Choi, H.-O. Pae, Y.-R. Jeong, Y.-M. Kim, and H.-T. Chung, “Critical role of heme oxygenase-1 in Foxp3-mediated immune suppression.,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 327, no. 4, pp. 1066–1071, 2005.
- [330] S. Zelenay, A. Chora, M. P. Soares, and J. Demengeot, “Heme oxygenase-1 is not required for mouse regulatory T cell development and function,” *Int. Immunol.*, vol. 19, no. 1, pp. 11–18, 2007.
- [331] J. F. George, A. Braun, T. M. Brusko, R. Joseph, S. Bolisetty, C. H. Wasserfall, M. a Atkinson, A. Agarwal, and M. H. Kapturczak, “Suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells is dependent on expression of heme oxygenase-1 in antigen-presenting cells.,” *Am. J. Pathol.*, vol. 173, no. 1, pp. 154–160, 2008.
- [332] M. H. Andersen, R. B. Sørensen, M. K. Brimnes, I. M. Svane, J. C. Becker, and P. Straten, “Identification of heme oxygenase-1 – specific regulatory CD8 + T cells in cancer patients,” vol. 119, no. 8, pp. 27–29, 2009.
- [333] E. Sierra-Filardi, M. a Vega, P. Sánchez-Mateos, A. L. Corbí, and A. Puig-Kröger, “Heme Oxygenase-1 expression in M-CSF-polarized M2 macrophages contributes to LPS-induced IL-10 release.,” *Immunobiology*, vol. 215, no. 9–10, pp. 788–795, 2010.
- [334] T.-S. Lee, H.-L. Tsai, and L.-Y. Chau, “Induction of heme oxygenase-1 expression in murine macrophages is essential for the anti-inflammatory effect of low dose 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 21, pp. 19325–30, May 2003.
- [335] D.-S. Lee, G.-S. Jeong, B. Li, H. Park, and Y.-C. Kim, “Anti-inflammatory effects of sulfuretin from *Rhus verniciflua* Stokes via the induction of heme oxygenase-1 expression in murine macrophages.,” *Int. Immunopharmacol.*, vol. 10, no. 8, pp. 850–8, Aug. 2010.
- [336] A. Harusato, Y. Naito, T. Takagi, K. Uchiyama, K. Mizushima, Y. Hirai, Y. Higashimura, K. Katada, O. Handa, T. Ishikawa, N. Yagi, S. Kokura, H. Ichikawa, A. Muto, K. Igarashi, and T. Yoshikawa, “BTB and CNC Homolog 1 (Bach1) Deficiency

Ameliorates TNBS Colitis in Mice: Role of M2 Macrophages and Heme Oxygenase-1,” *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 19, no. 4, pp. 740–53, Mar. 2013.

- [337] S. Tzima, P. Victoratos, K. Kranidioti, M. Alexiou, and G. Kollias, “Myeloid heme oxygenase–1 regulates innate immunity and autoimmunity by modulating IFN- β production,” *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 206, no. 5. The Rockefeller University Press, pp. 1167–1179, 2009.
- [338] A. Y.-L. So, Y. Garcia-Flores, A. Minisandram, A. Martin, K. Taganov, M. Boldin, and D. Baltimore, “Regulation of APC development, immune response, and autoimmunity by Bach1:HO-1 pathway in mice.,” *Blood*, vol. 120, no. 12, pp. 2428–37, Sep. 2012.
- [339] C. Chauveau, S. Rémy, P. J. Royer, M. Hill, S. Tanguy-royer, F. Hubert, L. Tesson, R. Brion, G. Beriou, M. Gregoire, R. Josien, M. C. Cuturi, I. Anegon, and W. Dc, “proinflammatory function but conserves IL-10 expression Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression,” vol. 106, no. 5, pp. 1694–1702, 2005.
- [340] M.-F. Mashreghi, R. Klemz, I. S. Knosalla, B. Gerstmayer, U. Janssen, R. Buelow, A. Jozkowicz, J. Dulak, H.-D. Volk, and K. Kotsch, “Inhibition of dendritic cell maturation and function is independent of heme oxygenase 1 but requires the activation of STAT3.,” *J. Immunol.*, vol. 180, no. 12, pp. 7919–7930, 2008.
- [341] S. Rémy, P. Blancou, L. Tesson, V. Tardif, R. Brion, P. J. Royer, R. Motterlini, R. Foresti, M. Painchaut, S. Pogu, M. Gregoire, J. M. Bach, I. Anegon, and C. Chauveau, “Carbon monoxide inhibits TLR-induced dendritic cell immunogenicity.,” *J. Immunol.*, vol. 182, no. 4, pp. 1877–84, Feb. 2009.
- [342] V. Tardif, S. a. Riquelme, S. Remy, L. J. Carreño, C. M. Cortés, T. Simon, M. Hill, C. Louvet, C. a. Riedel, P. Blancou, J. M. Bach, C. Chauveau, S. M. Bueno, I. Anegon, and A. M. Kalergis, “Carbon monoxide decreases endosome-lysosome fusion and inhibits soluble antigen presentation by dendritic cells to T cells,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 43, no. 11, pp. 2832–2844, 2013.
- [343] T. Simon, S. Pogu, V. Tardif, K. Rigaud, S. Rémy, E. Piaggio, J.-M. Bach, I. Anegon, and P. Blancou, “Carbon monoxide-treated dendritic cells decrease β 1-integrin induction on CD8⁺ T cells and protect from type 1 diabetes.,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 43, no. 1, pp. 209–18, Jan. 2013.
- [344] P. Blancou and I. Anegon, “Editorial: Heme oxygenase-1 and dendritic cells: what else?,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 87, no. 2, pp. 185–7, Feb. 2010.
- [345] B.-Z. Li, B. Guo, H.-Y. Zhang, J. Liu, S.-S. Tao, H.-F. Pan, and D.-Q. Ye, “Therapeutic Potential of HO-1 in Autoimmune Diseases,” *Inflammation*, vol. 37, no. 5, pp. 1779–1788, 2014.

-
- [346] S. H. J and K. Seid, "Heme oxygenase-1 in lesions of rat experimental autoimmune encephalomyelitis and neuritis.," *J. Neuroimmunol.*, vol. 110, no. 1–2, pp. 114–120, 2000.
- [347] Y. Liu, B. Zhu, L. Luo, P. P. Li, D. W.1.; and M. S. Cynader, "Heme oxygenase-1 plays an important protective role in experimental autoimmune encephalomyelitis.," 2001. [Online]. Available: <http://ovidsp.tx.ovid.com/gate2.inist.fr/sp-3.16.0b/ovidweb.cgi?QS2=434f4e1a73d37e8cdd8fbc96f8f18d4bc47c20c3a9d45dc972e0ecd8a539b8aed1abac5944363211788b8ec8e6322ebe5c5dbcd67a05da97216232c1cfbc7824355b6c55a54beae553c589826e7f8a1f1cda06a7d5bb824705033cacf71>. [Accessed: 06-Aug-2015].
- [348] A. A. Chora, P. Fontoura, A. Cunha, T. F. Pais, S. Cardoso, P. P. Ho, L. Y. Lee, R. A. Sobel, L. Steinman, and M. P. Soares, "Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress autoimmune neuroinflammation.," *J. Clin. Invest.*, vol. 117, no. 2, pp. 438–47, Feb. 2007.
- [349] P. Fagone, F. Patti, K. Mangano, S. Mammana, M. Coco, C. Touil-Boukoffa, T. Chikovani, R. Di Marco, and F. Nicoletti, "Heme oxygenase-1 expression in peripheral blood mononuclear cells correlates with disease activity in multiple sclerosis.," *J. Neuroimmunol.*, vol. 261, no. 1–2, pp. 82–6, Aug. 2013.
- [350] C.-M. Hu, H.-H. Lin, M.-T. Chiang, P.-F. Chang, and L.-Y. Chau, "Systemic expression of heme oxygenase-1 ameliorates type 1 diabetes in NOD mice.," *Diabetes*, vol. 56, no. 5, pp. 1240–7, May 2007.
- [351] M. Li, S. Peterson, D. Husney, M. Inaba, K. Guo, A. Kappas, S. Ikehara, and N. G. Abraham, "Long-lasting expression of HO-1 delays progression of type I diabetes in NOD mice," *Cell Cycle*, vol. 6, no. 5, pp. 567–571, 2007.
- [352] M. T. Abdel Aziz, M. F. El-Asmar, E. G. El Nadi, M. A. Wassef, H. H. Ahmed, L. A. Rashed, E. M. Obaia, D. Sabry, A. A. Hassouna, and A. T. Abdel Aziz, "The effect of curcumin on insulin release in rat-isolated pancreatic islets.," *Angiology*, vol. 61, no. 6, pp. 557–66, Aug. 2010.
- [353] R. Stocker and M. A. Perrella, "Heme oxygenase-1: a novel drug target for atherosclerotic diseases?," *Circulation*, vol. 114, no. 20, pp. 2178–89, Nov. 2006.
- [354] H. Zhang and H. J. Forman, "Signaling pathways involved in phase II gene induction by alpha, beta-unsaturated aldehydes.," *Toxicol. Ind. Health*, vol. 25, no. 4–5, pp. 269–78, Jan. .
- [355] B. Möllers, S. Klages, A. Wedel, M. Cross, E. Spooncer, T. M. Dexter, and R. Renkawitz, "The mouse M-lysozyme gene domain: identification of myeloid and differentiation specific DNaseI hypersensitive sites and of a 3'-cis acting regulatory element.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 20, no. 8, pp. 1917–24, Apr. 1992.

-
- [356] M. L. Woods, C. Cabañas, and Y. Shimizu, "Activation-dependent changes in soluble fibronectin binding and expression of beta1 integrin activation epitopes in T cells: relationship to T cell adhesion and migration.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 30, no. 1, pp. 38–49, Jan. 2000.
- [357] C. Stockhaus, T. Van Den Ingh, J. Rothuizen, and E. Teske, "A multistep approach in the cytologic evaluation of liver biopsy samples of dogs with hepatic diseases.," *Vet. Pathol.*, vol. 41, no. 5, pp. 461–70, Sep. 2004.
- [358] K. Blazek, H. L. Eames, M. Weiss, A. J. Byrne, D. Perocheau, J. E. Pease, S. Doyle, F. McCann, R. O. Williams, and I. A. Udalova, "IFN- λ resolves inflammation via suppression of neutrophil infiltration and IL-1 β production.," *J. Exp. Med.*, vol. 212, no. 6, pp. 845–53, Jun. 2015.
- [359] S. Dasgupta, A.-M. Navarrete, S. Delignat, B. Wootla, S. Andre, V. Nagaraja, S. Lacroix-Desmazes, and S. V Kaveri, "Immune response against therapeutic factor VIII in hemophilia A patients--a survey of probable risk factors.," *Immunol. Lett.*, vol. 110, no. 1, pp. 23–8, May 2007.

Annexes

Annexes :

Article II

Le monoxyde de carbone inhibe la maturation endosomale et la présentation antigénique dépendante des mitochondries dans les cellules dendritiques.

Sebastian A. Riquelme, **Julien Pogu**, Ignacio Anegón, Susan M. Bueno and Alexis M. Kalergis

Accepté dans European Journal of Immunology

Titre original : Carbon Monoxide Impairs Mitochondria-dependent Endosomal Maturation and Antigen Presentation in Dendritic Cells

(CF : PDF associé)

Thèse de Doctorat

Julien POGU

Etude des effets tolérogènes d'inducteurs de l'hème-oxygénase-1 dans les maladies auto-immunes

Study of the tolerogenic effects of Heme-oxygenase-1 inducers in autoimmune diseases

Résumé

Abstract

Un des obstacles majeurs à la prévention et au traitement des maladies auto-immunes réside dans la difficulté d'inhiber la réponse lymphocytaire T de manière antigène spécifique. Pour répondre à cette problématique, nous nous sommes intéressés aux inducteurs de l'hème-oxygénase (HO-1), dont les propriétés immunorégulatrices ont été mises en évidence dans nombreux modèles animaux. Nous avons donc développé un protocole innovant capable de tolérer de manière antigène spécifique des lymphocytes T (LT) auto-réactifs dans un modèle murin de maladie auto-immune neurodégénérative (EAE), et dans un modèle de diabète de type 1 (DT1). Ce protocole est basé sur la co-administration par voie intradermique (ID) d'un inducteur de l'HO-1 et d'un auto-antigène. Ce traitement induit le recrutement, dans le ganglion drainant, de cellules dendritiques dérivées de monocytes exprimant l'HO-1, capables de tolérer les LT auto-réactifs. Suite à ce traitement, les LT spécifiques de l'antigène présentent un défaut de migration dans l'organe cible, associé à une altération de leur cytosquelette. La vitesse et la migration de ces LT tolérés sont également affectées. Afin d'évaluer la pertinence clinique de ce protocole de tolérisation, nous avons démontré que l'injection ID d'un inducteur de l'HO-1, associé à un autoantigène, induit une inhibition transitoire de la réponse lymphocytaire chez le babouin dans un modèle d'hypersensibilité retardée (DTH). Ces résultats montrent que l'utilisation d'inducteurs de l'HO-1 en clinique représente une approche prometteuse dans le développement de tolérance antigène spécifique pour des patients souffrant de maladies auto-immunes.

One barrier to prevention and treatment of autoimmune diseases is the difficulty of antigen-specific tolerization of ongoing T-cell responses. Heme oxygenase-1 (HO-1) inducers are clinically approved drugs for non immune-related diseases that have shown anti-inflammatory properties in rodent models. We developed a protocol to tolerize on going autoreactive T-cells response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and type 1 diabetes (T1D) mice models by intradermal co-injection of HO-1 chemical inducer and autoantigen. This treatment induced recruitment in the draining lymph node of HO-1-expressing monocyte-derived DC (MoDC) that tolerized autoreactive pathogenic T-cells. Tolerized autoreactive T-cells showed impaired migration to the targeted organs that was associated with altered cytoskeleton, transmigration and velocity properties. Moreover, human T-cell clones showed reduced mobility following incubation with monocytes treated with HO-1 inducer. To explore the clinical relevance of this tolerisation protocol, we showed that intradermal injection of a clinically approved HO-1 inducer and antigen in primates extinguish delayed type hypersensitivity (DTH) for at least 2 month in all animals treated. Overall, clinically approved HO-1-inducers represent a promising approach for induction of antigen-specific tolerance in patients suffering from immune-mediated diseases.

Key Words

Heme-oxygenase, Autoimmunity, Tolerance, Cytotoxic T-cells, Primates, Inflammation, Leukocyte, Migration

Mots clés

Hème-oxygénase-1, Auto-immunité, Tolérance, Lymphocytes T auto-réactifs, Primates, Inflammation, Leucocyte, Migration