

Thèse de Doctorat

* (instructions page en annexe)

María Dolores LÓPEZ ROBLES

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : *BIOLOGIE SANTE*

Discipline : *BIOLOGIE MÉDICINE SANTÉ*

Spécialité : *IMMUNOLOGIE*

Unité de recherche : *UMR INSERM U1064 - CRTI*

Soutenu le *29-09-2017*

Thèse N° :

Étude de CLEC-1, un récepteur lectin-like de type C dans la fonction des cellules dendritiques et la tolérance immune

JURY

Président du jury	Mme Nuala MOONEY, Directeur de Recherche, Paris
Rapporteurs :	Mme Nuala MOONEY, Directeur de Recherche, Paris Mme Sylvaine YOU, Chargé De Recherche, Paris
Examineurs :	Mme María Cristina CUTURI, Directeur de Recherche, Nantes
Directeur de Thèse :	Mme Elise CHIFFOLEAU, Chargé de Recherche, Nantes

REMERCIEMENTS

A l'issue de ce travail, je tiens à remercier toutes les personnes grâce à qui la réalisation de cette thèse a été possible.

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Sylvaine YOU, le Dr Nuala MOONEY et le Dr Maria Cristina CUTURI, qui m'ont fait l'honneur de consacrer leur temps pour lire et juger mon travail et avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie tout particulièrement le Dr Régis JOSIEN pour m'avoir intégrée dans son équipe et surtout le Dr Elise CHIFFOLEAU pour m'avoir encadrée tout au long de la réalisation de ma thèse. Elle a été une source de connaissance et d'inspiration pour moi. Grâce à ton soutien et la confiance que tu m'as accordée.

Mille mercis, aux membres de mon comité de suivi de thèse, le Dr Jacques LE-PENDU et le Dr Frank HALARY, pour leur soutien et leurs conseils scientifiques, et spécialement le Dr LE-PENDU, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser un stage au sein de son équipe. Stage qui a été le commencement d'une route pleine de choses enrichissantes, qui prend fin avec cette thèse et qui ouvre la porte à de nouvelles expériences dans l'avenir.

Je tiens à remercier toutes les personnes de l'équipe 1, avec lesquelles j'ai eu l'honneur de travailler, particulièrement Virginie HUCHET et Annaïck PALLIER pour avoir travaillé à mes côtés dans l'exécution de ce projet et également Laurence D, Aurélie M, Cédric, Gaëlle B, Jason, Ahmed, Eros, Amandine, Flora, Aurélie F, Janina, Michèle H, Mélanie, Mathieu, Cecile, Lucile, Dorian, Céline pour votre soutien et votre disponibilité.

Je remercie vivement Manu et Claire pour leur aide, leur sympathie et leur gentillesse.

Merci à Adrien BREIMEN pour son soutien et toute la formation qui m'as apporté le premier mois de mon arrivée à Nantes.

Merci infiniment à Laurence DELBOS et Séverine BEZIE, pour être toujours ouvertes à m'écouter, pour leur amitié et pour tout le temps consacré à lire et corriger mon manuscrit.

Un grand merci à Gaëlle T, Laurent T, Apolline S, Gwenaëlle, Sabrina Carole Brosseau et Laure Hélène pour me transmettre leur bonheur au cours de ces dernières trois années.

Merci à Michelle, Justine, Eros, Jason, Ahmed, Camille, Antoine, Mélanie, Léa, Amandine, Laetitia, Raphaël, Lucas, Vanessa, Nadège, Mathieu, Virginie pour ces bons moments passés à vos côtés et ces super soirées. Je garderai toujours plein de bonnes anecdotes.

Un énorme merci à Diego (mon support, mon frère), Seba, Sev et Steph pour votre amitié inconditionnelle, sans vous cette thèse n'aurait pas été la même. Vous m'avez aidé à croire plus en moi-même et vous avez fait que les choses compliquées deviennent tout simplement faciles.

Merci aussi aux secrétaires Sylvie, Justine, Angelina et Laurence F pour m'aider dans tout ce qui est côté administratif (J'étais toujours perdu !).

Désolée pour ceux que j'ai oublié !

JE DEDIE CE TRAVAIL SPECIALEMENT

A Josefina Rolando, une grande personne et une grande copine. Depuis petite, elle a lutté contre les effets secondaires d'une greffe, mais toujours avec la joie et l'envie de vivre à 100%. Finalement elle a perdu cette guerre, mais elle a été ma source d'énergie et motivation tout au long de ma thèse. Para ti mi gran amiga !!

A mes parents et ma grand mère, pour m'avoir toujours encouragé dans l'idée de continuer mes études, pour tout leur amour, leur sacrifice, leur soutien et pour être toujours présents dans chaque situation de ma vie malgré la distance. Grâce à vous je suis arrivée jusque là.

A mon frère et ma belle sœur, pour être toujours à mes côtés dans les moments de bonheur ainsi que dans les moments difficiles, pour leur encouragement, leur soutien, leurs conseils et pour être toujours à mon écoute.

A mes deux nièces, pour m'apporter du bonheur, pour me faire toujours rire et pour m'aimer inconditionnellement. Elles sont le meilleur cadeau de ma vie.

A mes tantes, mes oncles, mes cousins et mes cousines, pour leur soutien et leur encouragement.

A mes grands-parents, qui sont déjà partis, je sais qu'ils sont toujours à mes côtés. Ils conservent une place très importante dans mon cœur.

A ma famille française, Annie, Chaffia, Alfonso et María, Diego, Seba, Nacho, Kambati, JB, Miguel, Eros, Ivania, Marco, Karina et Lukita, pour remplir ma vie hors du laboratoire. J'ai la chance de vous avoir rencontré !!

A mes amis, pour tous les bons moments partagés tout au long de ma vie !

Contenu

Lista des abréviations	1
Lista des figures	4
Introduction	5
I. Cellules dendritiques	5
1. Généralités	5
2. Sous-types de DCs chez la souris.....	6
2.1 Cellules dendritiques conventionnelles (cDCs)	6
2.1.1 Cellules dendritiques résidentes dans les tissus non lymphoïdes.....	6
a. Cellules dendritiques CD103+CD11b-	
b. Cellules dendritiques CD11b+	
2.1.2 Cellules de Langerhans épidermiques.....	8
2.1.3 Cellules dendritiques migratrices du tissu.....	8
2.1.4 Cellules dendritiques résidentes dans les tissus lymphoïdes.....	9
a. Cellules dendritiques CD8+	
b. Cellules dendritiques CD11b+	
2.2 Cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs).....	10
3. Sous-types de DCs chez l'homme.....	12
3.1 Cellules dendritiques du sang.....	12
3.2 Cellules dendritiques dans les tissus non lymphoïdes.....	12
3.3 Cellules de Langerhans épidermiques.....	12
3.4 Cellules dendritiques dans les tissus lymphoïdes.....	13
4. Cellules dendritiques dans l'immunité.....	14
4.1 Activation et polarisation des lymphocytes T.....	14
4.1.1 Reconnaissance des « signaux danger ».....	14
4.1.2 Maturation des DCs.....	18
4.1.3 Présentation d'antigènes.....	19
4.1.4 Signaux de co-stimulation.....	22
4.1.5 Polarisation de la réponse lymphocytaire T effectrice.....	24

4.2	Spécialisation des différents sous-types des DCs dans l'activation des LT.....	27
4.2.1	Activation des lymphocytes T CD4+.....	27
4.2.2	Activation des lymphocytes T CD8+.....	29
5.	Cellules dendritiques dans la tolérance	30
5.1	Tolérance centrale.....	30
5.2	Tolérance périphérique.....	32
5.3	Spécialisation dans la tolérance des différents sous-types de DCs.....	33
5.3.1	DCs CD8+/CD103+.....	33
5.3.2	DC CD11b+.....	34
5.3.3	pDCs.....	34
5.4	DCs tolérogènes en transplantation.....	36
5.4.1	Rejet de greffe.....	36
5.4.2	Génération des DCs tolérogènes ex vivo et leur potentiel thérapeutique.....	38
II.	C-type lectin receptors (CLRs)	40
1.	Généralités et structure	40
2.	Fonction et classification.....	42
2.1	CLRs couplés à « Spleen Tyrosine Kinase » (SYK)	44
2.2	CLRs avec des domaines (ITIM)	53
2.3	CLRs sans les domaines ITAM ni ITIM	56
3.	Le potentiel thérapeutique des CLRs	61
III.	Le « C-type lectin receptor-1 » (CLEC-1)	66
1.	Généralités	66
2.	Structure et homologie des CTLRs CLEC-1 et CLEC-2.....	66
3.	Localisation chromosomique et phylogénie de CLEC-1.....	68
4.	Profil d'expression tissulaire et cellulaire de CLEC-1 chez l'homme.	69
5.	Rôle potentiel de CLEC-1 en transplantation.....	70
	Objectifs du projet	74
	Article accepté dans « Blood advances», en 2017.	75
	Discussion	99
	Perspectives	110
	Bibliographie	116

AKT	Protein Kinase B
ASGPR-1	Asialoglycoprotein receptors
B7RP-1	B7-related protein-1
BCL-6	B cel lymphoma 6 protein
CARD	Caspase-activating and recruiting domain
CD207	Lectin de type C Langerin
CIITA	Class II, major histocompatibility complex, transactivator
CLEC-1	C-type lectin-like receptor-1
CLEC-2	C-type lectin-like receptor-2
CMH-I / II	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I / II
CMV	Cytomegalovirus
CNK	Connector enhancer of KSR
CRD	Carbohydrate recognition domain
CTL	Cellule T cytotoxique
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CTLD	C-type lectin-like domains
CTLR	C-type lectin-like receptors
CYLD	Lysine 63 deubiquitinase
DAG	Diacylglycerol
DAMP	Damage-associated molecular pattern
dbEST	Gen Banck expressed sequence tagged data base
DC	Cellules dendritiques
DCIR	Dendritic cell immunoreceptor
DC-SIGN	DC-spécifique ICAM-grabbing non integrin
DECTIN-1	Dendritic-cell-associated C-type lectin 1
DT	Diphtheria toxin

DTR	Diphtheria toxin receptors
EPCAM	Epithelial cell adhesion molecule
FcR γ	Fc receptor γ chain
Flt3	Fms-like tyrosine kinase
GATA-3	GATA-binding-factor 3
HAEC	Human aortic endothelial cells
HEK	Human embryonic kidney cells
HIV-1	Human immunodeficiency virus
HLA	Human leucocyte antigen
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
ICOS	Inducible T-cell co-stimulator
IDO	Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase
IFNAR	Interferon- α/β receptor
IKK ϵ	Serine/threonine I κ B kinase subunit- ϵ
IP $_3$	Inositol triphosphate
IPS-I	Interferon- β promotor
IRF5	Syk-dependent interferon-regulatory factor 5
ISGF3	IFN-stimulated gene factor 3
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activatory motif
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
KLH	Keyhole limpet hemocyanin
KSR1	kinase-suppressor of Ras1
LBD	Horseshoe-shaped ligand-binding
LOX-1	Lectin-like Oxidised LDL receptor-1
LSP1	Lymphocytes-specific protein 1
MCL	Macrophage-restricted C-type lectin

M-CSF	Macrophage colony stimulating facteur
MDSC	Myeloid-derived suppressor cells
MGL	Macrophage galactose lectin
MICL	Myeloid Inhibitory C-type-like Lectin
Mincle	Macrophage-inducible C-type lectin
MUC-1	Tumor-derived mucin
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
NIK	NF κ BI inducing Kinase
NKC	NK gene complex
NLR	Nucleotide-oligomerisation domain (NOD)-like receptors
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PD-1	Programed cell death-1
PI3K	Phosphatidyl inositol-3.4.5-triphosphate
PLC γ 2	Phospholipase C γ 2
PRR	Pattern recognition receptors
RE	Réticulum endoplasmique
RLR	Retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-1)-like receptors
ROR γ T	Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor γ isoform T
TAM	Tumor-associated macrophage
T-bet	T-box expressed in T cell
Tfh	T follicular helper
Th	T helper
TIR	Toll/IL-1 receptor
TLR	Récepteur toll-like
TSLP	Thymic stromal lymphopietin

- Figure 1 : Contrôle transcriptionnelle de la différenciation des DCs.
- Figure 2 : Phénotype des sous-types de DCs humaines.
- Figure 3 : Différentes familles de PRRs.
- Figure 4 : Présentation antigéniques par les complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I et II.
- Figure 5 : Cross-présentation antigénique par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I.
- Figure 6 : Molécules de co-stimulation positive ou négative.
- Figure 7 : Différenciation des lymphocytes T CD4⁺.
- Figure 8 : Structure du domaine CRD.
- Figure 9 : Structure du domaine CRD.
- Figure 10 : Signalisation de Dectin-1 dans la réponse Th.
- Figure 11 : Signalisation de Mincle dans la réponse Th.
- Figure 12 : Inhibition de la signalisation des TLRs et des récepteurs ITAM par DCIR.
- Figure 13 : Signalisation de DC-SIGN dans la réponse Th.
- Figure 14 : Signalisation de DC-SIGN dans la réponse Th.
- Figure 15 : Voies d'activation du NF-κB par Dectin-1.
-
- Tableau 1 : Classification des cDCs chez la souris.
- Tableau 2 : Induction des lymphocytes Tregs par les DCs.
- Tableau 3 : Classification des CTLRs.

Introduction

I. Cellules dendritiques

1. Généralités

Le système immunitaire est composé d'un nombre important de cellules responsables de la réponse innée et adaptative.

Les cellules du système inné sont équipées pour agir rapidement suite à la détection de molécules associées aux pathogènes à travers des récepteurs spécifiques, alors que l'immunité adaptative génère une protection spécifique de l'antigène qui prend plus de temps à se développer mais qui est dotée d'une composante mémoire lui permettant ainsi d'être effective sur le long terme.

Depuis la découverte de cellules dendritiques (DCs) par Ralph Steinman et Zanvil Cohn dans les années 1970 (Steinman and Cohn 1973, 1974), il est admis que les réponses innée et adaptative sont coordonnées. Il a ainsi été vraiment compris de manière conceptuelle la fonctionnalité du système immunitaire comme une unité cohérente. Dans un premier temps, les DCs vont détecter les pathogènes ou molécules endogènes liés au dommage tissulaire par les « Pattern recognition receptors » (PRR). Ensuite, elles vont présenter ces agents au système adaptatif qui développe une réponse spécifique à l'antigène. Les DCs sont dotées donc, de tout un système capable d'endocyter et dégrader partiellement les agents pathogènes ou protéines dérivées pour permettre leur présentation aux lymphocytes T qui ensuite prennent en charge cette réponse spécifique à l'antigène.

Les DCs sont donc considérées comme étant les sentinelles du système immunitaire capables de détecter les pathogènes dans l'organisme et connecter le système inné au système adaptatif pour une réponse immunitaire efficace et cohérente.

Les DCs sont également chargées de maintenir la tolérance immunitaire au niveau centrale et périphérique. A état d'équilibre, dans le thymus les DCs rencontrent des auto-antigènes en continu et les présentent aux cellules T pour la sélection de celles qui ne sont pas réactives. Cependant, certains lymphocytes autoréactifs échappent à cette sélection centrale et d'autres mécanismes impliquant les DCs sont mis en place en périphérie afin d'empêcher une réponse immunitaire non justifiée.

Ces généralités seront décrites plus en détail tout au long de cette introduction.

2. Sous-types de DCs chez la souris

2.1 Cellules dendritiques conventionnelles (cDCs)

Les cellules dendritiques conventionnelles (cDCs) constituent une petite partie du système hématopoïétique localisé dans les tissus lymphoïdes ou non lymphoïdes (Merad et al. 2013a). Ces cellules ont la capacité de détecter les dommages cellulaires, de phagocyter des antigènes associés à l'environnement et/ou aux cellules pour les présenter ensuite aux lymphocytes T. Les cDCs ont la capacité également de migrer lorsqu'elles sont chargées d'antigènes tissulaires vers les zones des cellules T dans les ganglions lymphatiques pour y effectuer la présentation antigénique. Grâce à ces processus, les cDCs induisent l'immunité contre les antigènes étrangers qui envahissent les tissus.

Les cDCs expriment de façon constitutive les marqueurs hématopoïétiques CD45, CMH-II (complexe majeur d'histocompatibilité de classe II) et CD11c. Elles expriment le récepteur de la tyrosine kinase « Fms-like tyrosine kinase » (Flt3 ou CD135) ce que permet de les discerner des macrophages (Merad et al. 2013a) (Figure 1).

Le rôle des cDCs en tant que sentinelles leur impose de détecter et de répondre de façon constante aux stimuli environnementaux à travers des changements phénotypiques. La classification des cDCs est basée sur la spécificité tissulaire, le développement hématopoïétique et leur spécialisation fonctionnelle, et elle ne considère pas la plasticité phénotypique. Quatre sous-types de cDCs ont été identifiés d'après leur ontogenèse et leur fonctionnalité (tableau 1).

2.1.1 Cellules dendritiques résidentes dans les tissus non lymphoïdes

Les cDCs constituent 1-5% des cellules des tissus (Merad et al. 2013a). Deux sous-types ont été identifiés principalement:

a. Cellules dendritiques CD103⁺CD11b⁻

Les cDCs CD103⁺ constituent 20-30% des cDCs totales. La plupart de ces cellules sont présentes dans les tissus conjonctifs comme la peau, le poumon, le foie, les reins et le pancréas. Elles partagent leur origine avec les DCs CD8⁺ résidant dans les organes lymphoïdes. Elles expriment un fort niveau de Flt3 par rapport aux DCs CD11b⁺, prolifèrent en réponse au ligand de Flt3, et diminuent très fortement chez la souris Flt3L^{-/-} (Ginhoux et al. 2009).

L'expression de l'intégrine CD103⁺ est dépendante de l'environnement du tissu et est régulée par la sécrétion du facteur de croissance Csf-2 (Zhan et al. 2011).

A l'exception des cDCs CD103⁺ du pancréas et du poumon, elles expriment le récepteur lectin de type C Langerin (CD207). Dans l'intestin, la plupart des cDCs CD103⁺ sont concentrées dans les plaques de Peyer et sont caractérisées par une faible expression de CMH-II et la co-expression de CD8⁺. Les autres cDCs CD103⁺ sont présentes dans la lamina propria et sont caractérisées par la co-expression de CD11b⁺ (Bogunovic et al. 2009).

b. Cellules dendritiques CD11b⁺

A l'exception de la sous-population localisée dans la lamina propria de l'intestin, où il existe une co-expression des intégrines CD103⁺ et CD11b⁺, les cDCs CD11b⁺ n'expriment pas le marqueur CD103⁺ (Merad et al. 2013a).

Les cDC11b⁺ proviennent de différents précurseurs. Dans le muscle, celles qui proviennent d'un précurseur commun spécifique des cDCs expriment le récepteur de l'immunoglobuline IgG, le FcYRI (CD64), qui permet de les différencier de celles qui proviennent des monocytes (Langlet et al. 2012). Dans la lamina propria, deux sous-types différents ont été également identifiés : les CD103⁺CX3CR⁻ qui migrent vers les ganglions lymphatiques et qui proviennent d'un précurseur commun spécifique des cDCs, et les CD103⁻CX3CR1⁺, non migratoires, qui proviennent des monocytes (Bogunovic et al. 2009; Schulz et al. 2009).

2.1.2 Cellules de Langerhans épidermiques

Les cellules de Langerhans sont localisées dans la couche épidermique de la peau. Elles constituent 3-5% des cellules de l'épiderme (Merad, Ginhoux, and Collin 2008).

En comparaison avec les cDCs des dermes, elles sont caractérisées par des faibles niveaux d'expression du CMH-II, des niveaux intermédiaires de CD11c⁺ et de très forts niveaux du récepteur lectin de type C Langerin (CD207) (Merad et al. 2013a). Contrairement à la plupart des DCs, elles se développent de façon indépendante de Flt3 et Flt3L, mais elles sont dépendantes d'un autre facteur de croissance, le « macrophage colony stimulating facteur » (Csf-1R ou M-CSF) (Ginhoux et al. 2006).

2.1.3 Cellules dendritiques migratoires du tissu

Les cDCs migratoires du tissu sont les cDCs qui résident dans les tissus non lymphoïdes mais ont la capacité de migrer vers les ganglions lymphatiques périphériques. A l'état d'équilibre, et en comparaison aux cDCs non migratoires, ces cellules sont caractérisées par une forte expression de CMH-II et de faible à intermédiaire de CD11c (Merad et al. 2013a).

Les cDCs chargées d'antigènes vont à la rencontre des lymphocytes T présents dans les ganglions à travers les vaisseaux lymphatiques afférents. Cette migration est constante à l'état basal (Randolph, Angeli, and Swartz 2005) et fortement augmentée en réponse aux signaux inflammatoires (Randolph, Ochando, and Partida-Sánchez 2008). Elle est très fortement dépendante de la régulation du récepteur de chimiokine CCR7. L'expression de CCR7 est corrélée avec la régulation positive du CMH-II et des molécules de co-stimulation qui a lieu dans des conditions de maturation (Ohl et al. 2004). Les processus de maturation et de migration des cDCs peuvent se produire en conditions physiologiques basales et également en conditions inflammatoires. Dans ce dernier cas, les cDCs produisent aussi des cytokines inflammatoires et des molécules de co-stimulation impliquées dans l'immunité adaptative (Reis e Sousa 2006).

2.1.4 Cellules dendritiques résidentes dans les tissus lymphoïdes

Les cDCs résidentes d'organes lymphoïdes vont se différencier, exercer leurs fonctions et mourir à l'intérieur de ces organes. Elles constituent la totalité des cDCs dans la rate, alors que dans les ganglions lymphatiques, elles coexistent avec les cDCs migratoires des tissus. Elles peuvent être également présentes dans les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses du nasopharynx, et coexister avec les cDCs CD103⁺ et CD11b⁺ dans les plaques de Peyer associés à l'intestin (Merad et al. 2013a). Deux sous-types différents ont été identifiés :

a. Cellules dendritiques CD8⁺

Les cDCs CD8⁺ représentent 20-40% des cDCs de la rate et des ganglions lymphatiques, alors que dans le thymus elles constituent presque la totalité des cDCs (Wu and Shortman 2005). Elles sont phénotypiquement et fonctionnellement semblables aux cDCs CD103⁺ résidant dans les tissus non lymphoïdes. Au niveau phénotypique, elles sont caractérisées par l'absence ou le faible niveau d'expression de l'intégrine CD11b et par l'expression aussi de différents récepteurs lectines comme le DEC-205, le Clec9A et la langerin (Merad et al. 2013a). Elles expriment un fort niveau de Flt3 et prolifèrent donc en réponse à son ligand (Waskow et al. 2008).

b. Cellules dendritiques CD11b⁺

A exception du thymus, les cDCs CD11b⁺ sont la sous-population des cDCs prédominante dans les organes lymphoïdes. Elles sont caractérisées par l'absence du marqueur CD8, et comme les cDCs CD8⁺, elles expriment un fort niveau de Flt3, et prolifèrent in situ en réponse au Flt3L (Merad et al. 2013a).

Dans le Thymus, les cDCs CD11b⁺ expriment aussi le CD172a (SIRPα), et par rapport aux cDCs CD8⁺, montrent un phénotype plus mature et une plus forte expression des chimiokines CCL22 et CCL17 spécifiques des lymphocytes T CD4⁺ (Proietto et al. 2008). Dans la rate, deux sous-populations différentes ont été

identifiées en fonction de l'expression des molécules d'adhésion spécifiques aux cellules endothéliales. Les cDCs ESAM^{hi}CD11b⁺ expriment des niveaux élevés de CD4, CD11c, et des faibles niveaux des Csf-1R et Csf-3R et du récepteur de chimiokine CCR2 en comparaison aux cDCs ESAM^{lo}CD11b⁺. Les ESAM^{hi}CD11b⁺ dérivent d'un précurseur spécifique des DCs, alors que les ESAM^{lo}CD11b⁺ pourraient dériver des monocytes ou macrophages circulants (Lewis et al. 2011a).

2.2 Cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs)

Les pDCs représentent un sous-type de DCs qui partagent une origine similaire (Figure 1) mais un cycle de vie différent aux DCs conventionnelles. Elles s'accumulent principalement dans le sang et les tissus lymphoïdes et migrent vers les ganglions lymphatiques (LN) par la circulation sanguine (Merad et al. 2013a).

Les pDCs expriment de faibles niveaux de complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) et de molécules de co-stimulation. Elles expriment également l'intégrine CD11c à faible niveau à l'état d'équilibre ainsi que des PRR comme les récepteurs Toll-like (TLR) 7 et 9. Ces TLR permettent la reconnaissance d'acides nucléiques étrangers ce qu'induit une forte expression d'IFN de type I et une forte capacité à présenter des antigènes étrangers.

Classification des cDCs chez la souris	
Résidentes dans les tissus lymphoïdes	CD8⁺CD11b^{lo}DEC-205⁺Clec9A⁺Langerin⁺ (Rate, ganglion et thymus) CD11b⁺CD8⁻ (Rate et ganglion) CD11b⁺SIRPα⁺CCL22⁺CCL17⁺ (Thymus) CD11b⁺ESAM^{+/lo} (Rate)
Résidentes dans les tissus nonlymphoïdes	CD103⁺CD11b⁻ (peau, foie, rein et pancréas) CD103⁺CD11b⁻CD8^{+/-} (intestin) CD103⁺CD11b⁺CD8^{+/-} (intestin) CD103-CD11b⁺CD64⁺ (muscle)
Résidentes dans les tissus lymphoïdes	CMH-II ^{lo} CD11c ^{lo} CD207 ^{hi}
Migratoires du tissu	CMH-II ^{lo} CD11c ^{lo} CCR7 ^{lo} en état d'équilibre CMH-II ^{hi} CD11c ^{lo} CCR7 ^{hi} en inflammatoire

Tableau 1. Classification des cDCs chez la souris.

I. Cellules Dendritiques

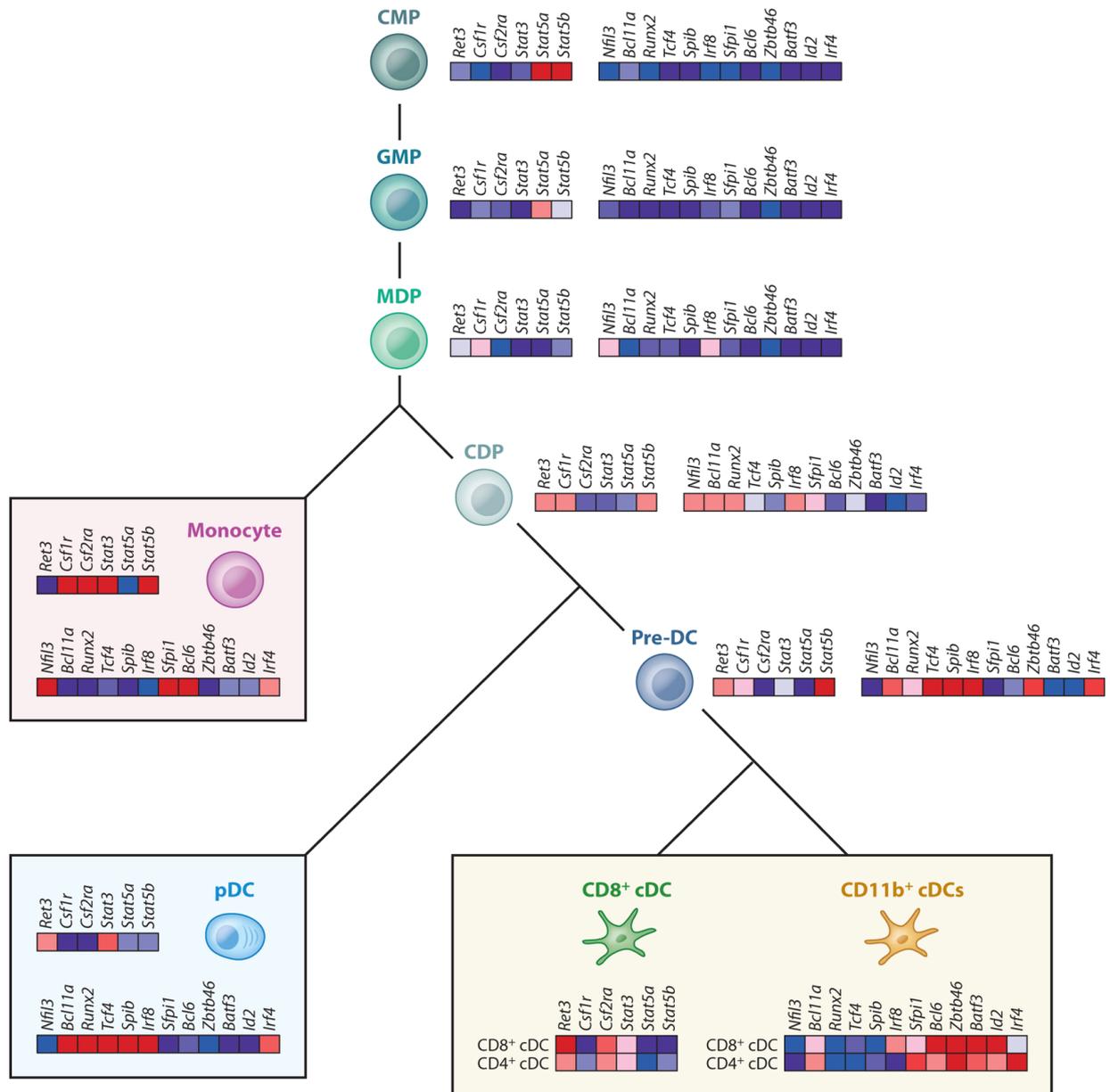


Figure 1. Contrôle transcriptionnelle de la différenciation des DCs.

Modifiée d'après Merad et al. (Merad et al. 2013b).

Niveaux d'expression de cytokines, TLR, et certains facteurs de transcription associés aux cellules myéloïdes dérivées à partir des progéniteurs commun de myéloïdes (CMPs) qui vont se différencier en progéniteurs commun de granulocytes (GMPs), progéniteurs commun de macrophages (MDPs), progéniteurs commun de DCs (CDPs), progéniteurs de cDCs circulantes (Pre-DCs), monocytes, DCs plasmacytoïdes (pDCs) et DCs résidentes dans le tissu lymphoïdes (CD8⁺ cDCs et CD11⁺ cDCs).

(Rouge = forte expression génétique / Bleu = faible expression génétique)

3. Sous-types de DCs chez l'homme

3.1 Cellules dendritiques du sang

Dans le sang, les pDCs humaines sont caractérisées comme étant $\text{Lin}^- \text{CMH}^- \text{II}^+ \text{CD303} (\text{BDCA2})^+ \text{CD304} (\text{BDCA4})^+$, alors que les cDCs sont caractérisées comme $\text{Lin}^- \text{CMH}^- \text{II}^+ \text{CD11c}^+$. Dans les cDCs, il a été identifié une sous-population largement prédominante caractérisée par l'expression de CD1c (BDCA1), et une autre sous-population mineure caractérisée par l'expression de CD141 (BDCA3) (Merad et al. 2013b).

3.2 Cellules dendritiques dans les tissus non lymphoïdes

Trois sous-types de DCs ont été identifiés dans le derme humain, les $\text{CD1a}^+ \text{CD14}^-$ et les $\text{CD1a}^- \text{CD14}^+$ (Nestle et al. 1993; Lenz et al. 1993) et plus récemment, les CD141^+ (Zaba, Krueger, and Lowes 2009) caractérisées en plus par l'expression des récepteurs XCR1 (récepteur de chimiokine), TLR3, CLEC9A et de la molécule d'adhésion Nectins Necl2 (Haniffa et al. 2012).

Les sous-populations trouvées dans le poumon, le rein et la lamina propria de souris immunodéficientes humanisées reconstituées avec des progéniteurs hématopoïétiques humains sont similaires. Dans le poumon et le rein, deux sous-populations ont été identifiées, les $\text{DNNGR-1}^+ \text{BDCA3}^+ \text{CD11b}^-$ et les $\text{DNNGR-1}^- \text{BDCA3}^- \text{CD11b}^+$; également la sous-population $\text{DNNGR}^+ \text{CD11c}^+ \text{HLA-DR}^+$ a été facilement identifiée dans la lamina propria (Lionel F. Poulin et al. 2012).

3.3 Cellules de Langerhans épidermiques

Elles sont caractérisées par l'expression de CD45, « Human leucocyte antigen » (HLA-II), « epithelial cell adhesion molecule » (EPCAM), et « lectin de type C Langerin » (CD207) (Valladeau et al. 1999). Contrairement aux souris, ces cellules sont aussi caractérisées par une forte expression de CD1a (précédemment appelé OKT6) (Fithian

et al. 1981), un membre du groupe 1 des protéines CD1 impliqué dans la présentation d'antigènes lipidiques aux cellules T (Hunger et al. 2004).

3.4 Cellules dendritiques dans les tissus lymphoïdes

Deux sous-types ont été identifiés comme résidents dans la rate humaine qui ressemblent aux DCs du sang : les CD1c⁺ et les CD141⁺ (McIlroy et al. 2001; Lionel Franz Poulin et al. 2010). Dans les ganglions lymphatiques et dans les amygdales ont été également identifiés ces mêmes sous-types des cellules. En outre, dans les ganglions lymphatiques trois sous-types de DCs migratoires ont été aussi identifiés : les DCs CMH-II^{hi}CD11c^{int}EpCAM⁺CD1a⁺ (cellules de Langerhans migratoires), EpCAM⁻CD1a⁺ (DCs CD1a⁺ dermales migratoires) et CD206⁺ (DCs CD14⁺ dermales migratoires) (Segura et al. 2012). Dans le thymus, le profil majeur des DCs est CD11c⁺CD11b⁻CD45RO^{lo} qui ressemblent aux DCs CD141⁺ chez l'homme et DCs CD8⁺ chez la souris. Un autre profil mineur a été identifié, les CD11c^{hi}CD11b⁺CD45RO^{hi} qui ressemblent aux CD11b⁺CD172a⁺ thymiques chez la souris (Shortman and Liu 2002).

Les différents sous-types des DCs humaines sont représentés dans la figure 2.

I. Cellules Dendritiques

	 pDC	 BDCA1 ⁺ (CD1c) ⁺	 BDCA3 ⁺ (CD141) ⁺	 LC	 CD14 ⁺	 CD1a ⁺
Phenotype:	Lin ⁻ HLA-DR ⁺ CD11c ^{low} CD1a ⁻ CD123 ^{hi} BDCA2 ⁺ BDCA4 ⁺	Lin ⁻ HLA-DR ⁺ CD11c ⁺ CD1a ⁻ BDCA1 ⁺ BDCA3 ^{+/-} CD11b ^{low}	Lin ⁻ HLA-DR ⁺ CD11c ⁺ CD1a ⁻ BDCA1 ⁻ BDCA3 ⁺ CD11b ^{low} CD141 ⁺ Necl2 ⁺ Xcr1 ⁺ Clec9a ⁺ Dec205 ^{hi}	Lin ⁻ HLA-DR ⁺ CD11c ⁺ CD1a ⁺ CD14 ⁻ BDCA1 ⁺ Langerin ⁺ EpCAM ⁺ Sirpa ⁺ CD11b ^{+/-} E-cadherin ⁺	Lin ⁻ HLA-DR ⁺ CD11c ⁺ CD1a ⁻ CD14 ⁺ BDCA1 ⁺ Langerin ⁻ EpCAM ⁻ DC-SIGN ⁺ FXIIIa ⁻ CD163 ⁻	Lin ⁻ HLA-DR ⁺ CD11c ⁺ CD1a ⁺ CD14 ⁻ BDCA1 ⁺ Langerin ⁻ EpCAM ⁻ Sirpa ⁺ CD11b ^{hi}
PRRs:	TLR1 ⁺ , TLR2 ⁻ , TLR3 ⁻ , TLR4 ⁻ , TLR6 ⁺ , TLR7 ⁺ , TLR8 ⁻ , TLR9 ⁺	ND	TLR1 ⁺ , TLR2 ⁺ , TLR3 ⁺ , TLR4 ⁻ , TLR6 ⁺ , TLR7 ⁻ , TLR8 ⁺ , TLR9 ⁻	TLR1 ⁺ , TLR2 ⁺ , TLR3 ^{lo} , TLR4 ⁻ , TLR6 ⁺ , TLR7 ⁻ , TLR8 ⁻ , TLR9 ⁻	ND	ND
Murine equivalent:	pDC	cDC	CD8 ⁺ cDC	LC	ND	Dermal DC
Location:	Blood and lymphoid tissue			Epidermis		Dermis
				Cutaneous tissue		

Figure 2. Phénotype des sous-types de DCs humaines.

D'après Merad et al. (Merad et al. 2013b).

Résumé du phénotype et du profil d'expression de récepteurs de pathogènes. (ND = non déterminé)

4. Cellules dendritiques dans l'immunité

4.1 Activation et polarisation des lymphocytes T

4.1.1 Reconnaissance des « signaux de danger »

Les DCs possèdent un ensemble de récepteurs qui sont essentiels pour initier une réponse immunitaire efficace face aux agents pathogènes. Ces récepteurs, appelés « Pattern recognition receptors » (PRR), reconnaissent des signatures moléculaires très conservées tout au long de l'évolution par les microbes, parasites et virus. Ces structures sont connues comme « Pathogen-associated molecular patterns » (PAMPs) (Janeway 1989). La reconnaissance des ligands par ces récepteurs permet l'activation de voies de signalisation qui ont pour but de réguler les processus biologiques cellulaires tels que la dynamique des endosomes ou du cytosquelette, et d'induire la

production des chimiokines et cytokines responsables de la maturation et de l'activation des DCs.

Certains de ces récepteurs ont aussi la capacité de reconnaître des molécules endogènes liées au dommage ou stress cellulaire. Ces molécules sont connues comme « Damage-associated molecular patterns » (DAMPs). Ces deux groupes de molécule, les PAMPs et DAMPs, ne sont pas mutuellement exclusives mais peuvent faire partie d'un système d'alerte évolutivement ancien régulant ainsi la réponse immunitaire (Seong and Matzinger 2004).

Au cours des 10 dernières années, différents types de PRRs ont été découverts chez les vertébrés. Ils ont été divisés en quatre familles (Plato, Willment, and Brown 2013) (Figure 3):

- « Toll-like receptors » (TLRs)

Les TLRs ont été considérés comme les premiers déclencheurs d'alarme du système immunitaire inné face à l'invasion d'organismes infectieux. Ils ont été largement décrits dans la littérature et jusqu'à présent, 13 membres différents ont été identifiés avec des fonctions et des profils d'expression différents (Plato, Willment, and Brown 2013).

Les TLRs sont des récepteurs transmembranaires de type I qui contiennent un domaine extracellulaire « horseshoe-shaped ligand-binding » (LBD) et un domaine de signalisation intracellulaire « Toll/IL-1 receptor » (TIR) connectés par une région transmembranaire (Leulier and Lemaitre 2008; Yamamoto and Takeda 2010). Les fonctions attribuées aux TLRs sont dépendantes de la localisation au niveau cellulaire et des ligands reconnus. Par exemple, les TLR1, 2, 4, 5, 6 et 10 sont exprimés à la surface des cellules et reconnaissent des composants des membranes cellulaires bactériens et fongiques, tandis que le TLR3, 7, 8, et 9 sont exprimés au niveau de vésicules intracellulaires et reconnaissent les acides nucléiques provenant des bactéries et virus (Tarang, Kumar, and Batra 2012). De façon spécifique à la reconnaissance de ligands, les TLRs induisent différentes voies de signalisation qui

activent le NF κ B ou les protéines kinases MAP et dirigent, par conséquent, la réponse innée et successivement la réponse adaptative (Plato, Willment, and Brown 2013).

- « Nucleotide-oligomerisation domain (NOD)-like receptors » (NLRs)

Les NLRs, dont la localisation est entièrement intracellulaire, présentent des fonctions très importantes dans la réponse immunitaire innée suite à la reconnaissance des PAMPs présents au niveau cytoplasmique. Ils sont impliqués dans la réponse pro-inflammatoire mais aussi anti-inflammatoire, et jouent un rôle très important dans la modulation de la réponse immunitaire adaptative. A l'heure actuelle, 23 membres chez l'homme, et 34 chez le rongeur ont été identifiés (Plato, Willment, and Brown 2013).

Ces récepteurs contiennent un domaine C-terminal impliqué dans la reconnaissance directe ou indirecte des PAMPs, et aussi bien un domaine central NOD impliqué dans l'oligomérisation avec d'autres NLRs activés. Ils ont été classifiés selon deux groupes différant par leur domaine N-terminal: la sous-famille « Nod » qui contient au moins un « caspase-activating and recruiting domain » (CARD), et la sous-famille « NLRP » qui présente un domaine « pyrin ». Ces domaines N-terminal permettent l'interaction du récepteur activé avec des protéines adaptatrices à travers la formation de complexes CARD-CARD ou pyrin-pyrin et l'activation successive des voies de signalisation (Rubino et al. 2012; Strober et al. 2006).

Les deux membres les plus étudiés chez la sub-famille « Nod » sont NOD1 et NOD2. Ces récepteurs reconnaissent des PAMPs associés à la membrane cellulaire des bactéries qui déclenchent leur activation. NOD1 et NOD2, avec respectivement un ou deux domaines CARD, vont recruter l'adaptateur RIP2 permettant l'activation de NF κ B, par ubiquitination et dégradation de son inhibiteur I κ B α , crucial pour induire la réponse immune (Strober et al. 2006; Schneider et al. 2012).

Douze membres ont été identifiés chez la sous-famille « NLRP ». Certains membres comme NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP4, NLRP5, NLRP6 et NLRP7, suite à leur activation, vont faire partie d'un complexe protéique oligomérique impliqué dans l'immunité innée : l'inflammasome. Ce complexe favorise la maturation des cytokines

inflammatoires comme l'IL-1 β par l'activation de la Caspase-1, ce qui est très important dans la régulation de la réponse immunitaire (Schneider et al. 2012).

- « Retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-1)-like receptors » (RLRs)

Les RLRs sont des récepteurs de surveillance cytoplasmique capables de détecter l'ARN viral qui est inséré directement dans les cellules hôtes ou qui a été libéré dans le cytoplasme après pénétration par récepteur et dégradation de la capsid virale. Trois RLRs ont été identifiés, le RIG-I, le MDA5 et le LGP2 (Plato, Willment, and Brown 2013).

Au niveau de la structure, ils contiennent un domaine de reconnaissance aux ARNs double brin, et à l'exception du récepteur LGP2, ils présentent plusieurs « caspase-activating and recruiting domains » (CARDs) disposés en tandem dans le domaine N-terminal. Le récepteur RIG-I contient aussi un domaine répresseur impliqué dans le contrôle de l'activation de sa voie de signalisation (Kumar, Kawai, and Akira 2011; Leung, Basler, and Amarasinghe 2012).

Les récepteurs RIG-I et MDA5 reconnaissent l'ARN viral provenant de différentes espèces de virus, et donc ils déclenchent des voies de signalisation de façon spécifique à l'espèce. Plusieurs études montrent le rôle du récepteur LGP2 comme un régulateur activateur de RIG-I et MDA5 en leur conférant la capacité de reconnaissance du ligand. L'activation de RIG-I et MDA5 permet de recruter l'adaptateur « interferon- β promotor » (IPS-I) présente dans les mitochondries et les peroxysomes vers les domaines CARDs et active le NF- κ B via les Caspases 8 et 10, TRADD et FADD, et donc l'activation de la réponse immunitaire contre l'infection virale (Kawai et al. 2005; Takahashi et al. 2006).

- « C-type lectin-like receptors » (CLRts)

Ils sont décrits en détail dans la partie (II).

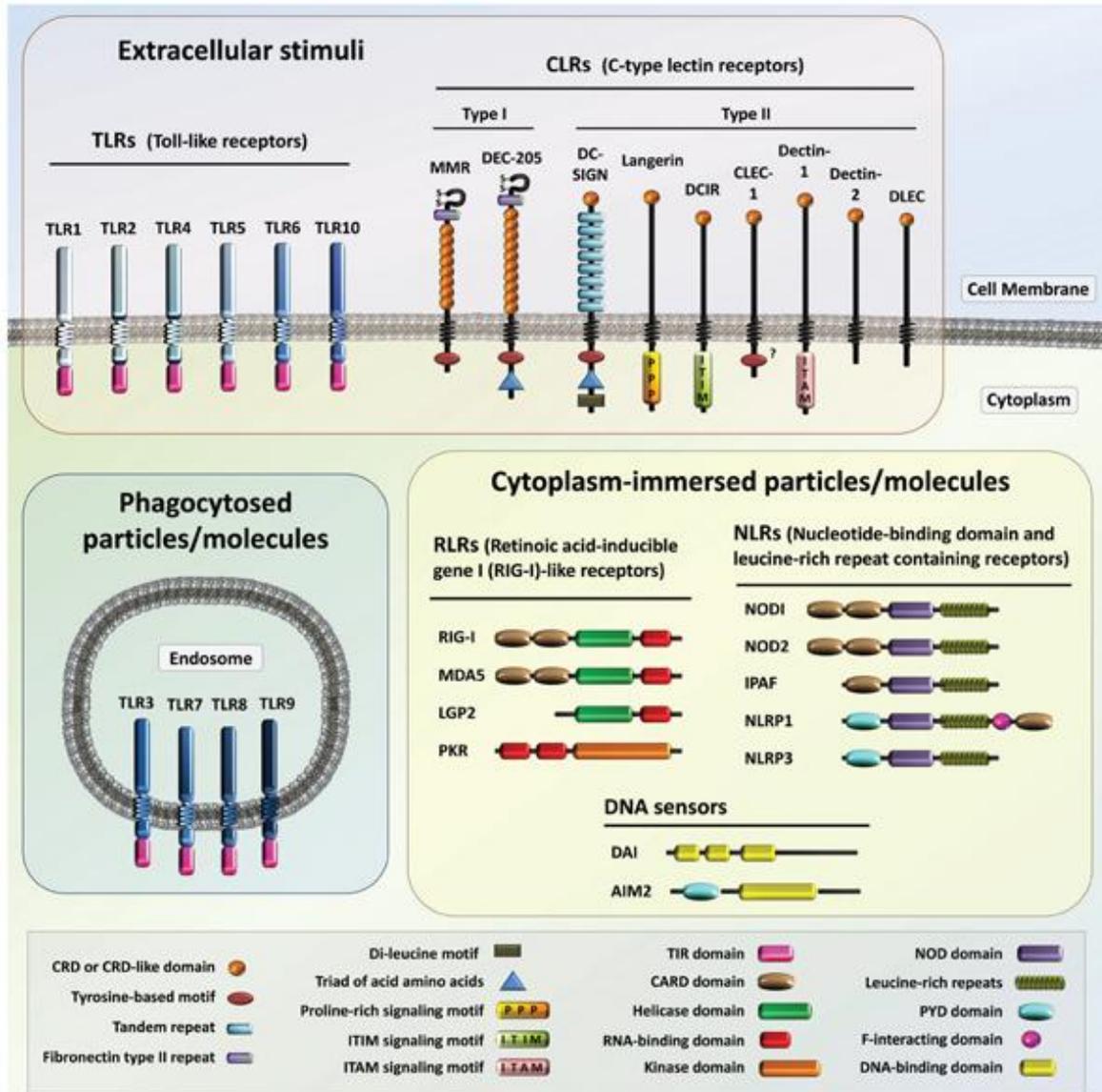


Figure 3. Différentes familles de PRRs.

D'après Miyaji et al. (Miyaji et al. 2011).

4.1.2 Maturation des DCs

Il existe deux états fonctionnels différents pour les DCs (I. Mellman and Steinman 2001; Hammer and Ma 2013): un état immature et un état mature. Les DCs immatures sont généralement trouvées dans les tissus périphériques et sont aptes à l'endocytose des pathogènes, plus particulièrement par la macropinocytose et la phagocytose. Cependant, dans cet état, les DCs sont incapables de présenter des

antigènes aux cellules T. Ces cellules vont synthétiser le CMH de classe I et II, mais ils sont relativement inefficaces dans la formation des complexes CMH-peptide au niveau de la membrane plasmique du fait d'une activité des protéases lysosomales atténuée. Tout ceci conduit à une diminution de l'accumulation de complexes chargés d'antigènes à la surface des DCs. En outre, les DCs immatures sécrètent également très peu de cytokines immuno-stimulatrices et de molécules de co-stimulation nécessaires pour l'activation lymphocytaire (Hammer and Ma 2013).

Les DCs immatures sont capables de passer à un état mature en présence des ligands spécifiques des PRRs, de récepteurs intracellulaires et aussi en présence de molécules pro-inflammatoires. Dans ce nouvel état, l'endocytose et l'activité lysosomale sont optimales. Une surexpression des CMH de classe I et II est mise en place, et l'ubiquitination du CMH de classe II est diminuée. Ces conditions permettent une parfaite formation des complexes CMH-antigènes au niveau de la surface cellulaire qui seront ensuite présentés aux lymphocytes T (Hammer and Ma 2013).

Les DCs matures migrent des tissus aux organes lymphoïdes grâce à l'augmentation de l'expression du CCR7, à la surexpression des ligands de molécules de co-stimulation et de cytokines. Les DCs matures sont donc capables non seulement d'activer les lymphocytes T, mais aussi d'entraîner différentes réponses lymphocytaires dépendantes des pathogènes ou molécules endogènes rencontrées (Hammer and Ma 2013).

4.1.3 Présentation d'antigènes

Il existe deux voies classiques de présentation antigénique connues dans la littérature :

- La présentation via le CMH de classe II (Ira Mellman 2013) (Figure 4). Cette présentation est associée à la capture d'antigènes provenant de sources extracellulaires. Les antigènes issus de bactéries, protozoaires, allergènes ou de cellules mortes sont internalisés par endocytose. Les endosomes fusionnent alors avec des lysosomes ce qui abaisse progressivement le pH et permet une

forte activité hydrolytique pour dégrader les protéines, les acides nucléiques, les oligo et polysaccharides, les lipides simples et complexes, et bien d'autres constituants biologiques importants. Dans les DCs, notamment les DCs immatures, les molécules CMH de classe II synthétisées dans le réticulum endoplasmique (RE) sont amenées à fusionner avec les endosomes qui contiennent les antigènes dénaturés et partiellement dégradés pour une liaison correcte au CMH de classe II. Après maturation, les complexes peptide-CMH sont transférés à la surface pour être présentés aux lymphocytes T CD4⁺.

- La présentation via le CMH de classe I (Ira Mellman 2013) (Figure 4). Cette présentation est associée aux peptides provenant des composants synthétisés de façon endogène, comme par exemple des protéines cytoplasmiques virales dans les cellules infectées. Ces protéines sont ubiquitinées et dégradées par le protéasome. Les peptides résultant sont dirigés dans le RE via le transporteur de peptide, TAP1 / TAP2 ATP-dépendant, et associés ensuite aux molécules CMH de classe I. Les complexes CMH de classe I-peptide compétents sont finalement transportés via l'appareil de Golgi à la membrane cellulaire pour être présentés aux lymphocytes T CD8⁺.

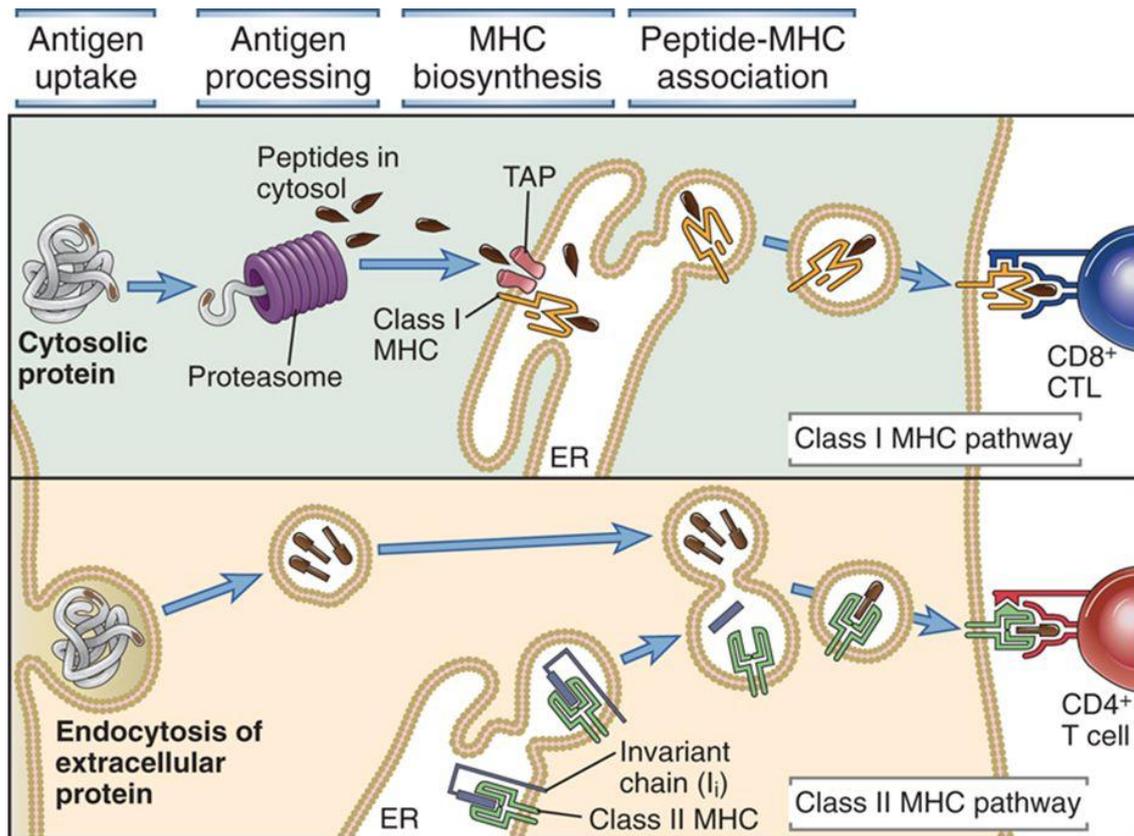


Figure 4. Présentation antigénique par les complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I et II.
 D'après Abbas et al : Cellular and Molecular Immunology, 7^e.

A la différence d'autres types de cellules présentatrices d'antigènes, un troisième mécanisme de présentation antigénique a été montré dans les DCs (Joffre et al. 2012) (Figure 5) : La cross-présentation antigénique. Les DCs ont la particularité de pouvoir capturer et endocyter des antigènes extracellulaires et de les présenter aux cellules T CD8⁺ via le CMH de classe I par deux voies différentes : la voie cytosolique et la voie vacuolaire. Dans la voie cytosolique, les antigènes s'échappent des phagosomes et sont dégradés par le protéasome cytosolique. Les peptides sont ensuite dirigés à l'intérieur du RE ou des phagosomes, où ils sont associés aux CMH de classe I pour être présentés. Dans la voie vacuolaire, les peptides sont dégradés dans les endosomes et associés au CMH de classe I dans le même compartiment endocyttaire.

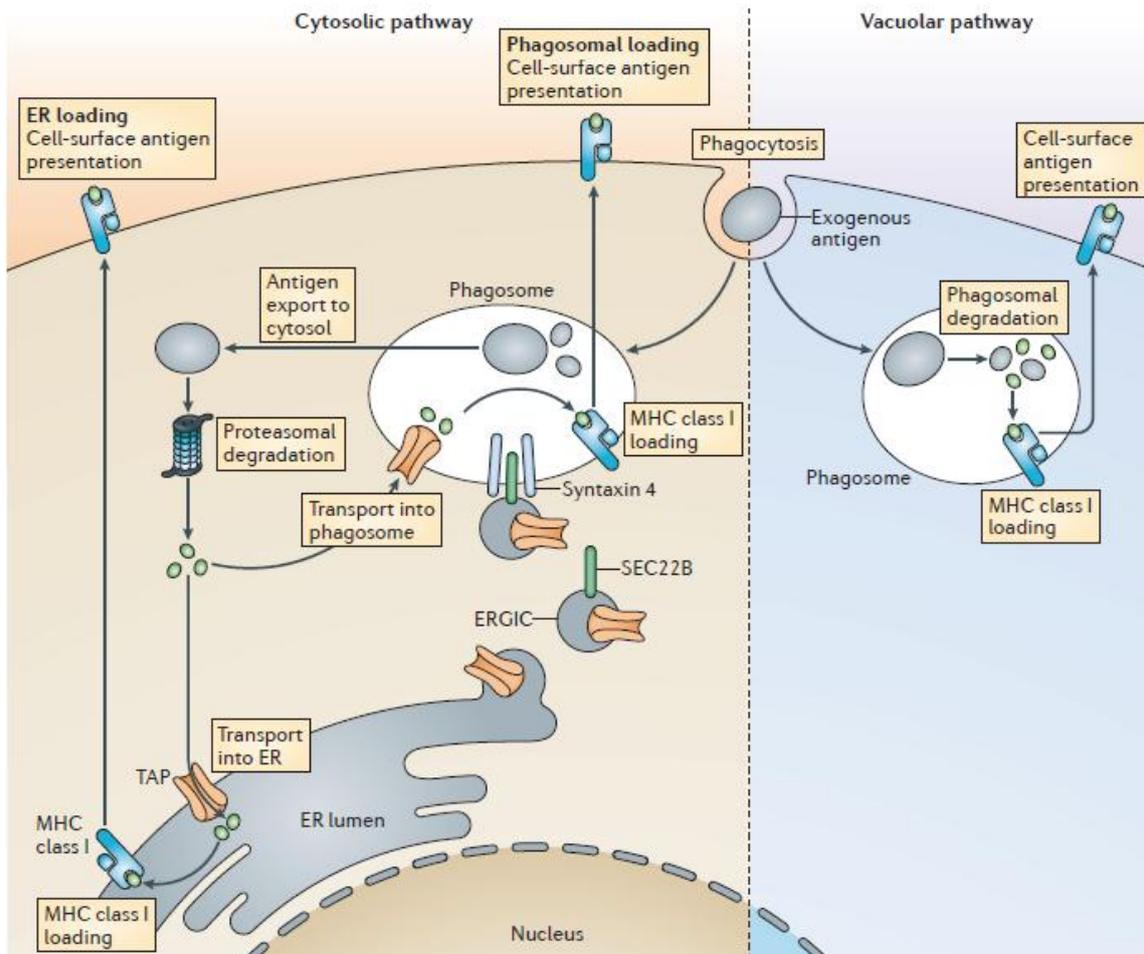


Figure 5. Cross-présentation antigénique par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I.
 D'après Joffre e al. (Joffre et al. 2012).

4.1.4 Signaux de co-stimulation

La reconnaissance de l'antigène par le récepteur T (TCR) aboutit à l'activation des cellules T. Cependant, l'engagement du TCR avec le complexe CMH-peptide n'est pas suffisant pour initier la cascade de signalisation intracellulaire menant à l'activation de la cellule. Les DCs doivent apporter un deuxième signal aux cellules T naïves par l'intermédiaire des molécules de co-stimulation présentes à leur surface. Ces molécules interagissent avec les récepteurs correspondant à la surface des cellules T (Lafferty, Andrus, and Prowse 1980) (Figure 6).

Le premier récepteur de co-stimulation identifié a été le récepteur CD28 (June et al. 1990). Ce récepteur reconnaît des ligands de la famille B7 exprimés à la surface

cellulaire des DCs, le B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86). Cette interaction permet la formation de micro-cluster avec le TCR et le recrutement de la protéine kinase C theta (PKC θ) qui va initier la cascade d'activation dans les cellules T (Yokosuka and Saito 2009). Un deuxième récepteur homologue à CD28 associé aux lymphocytes T cytotoxiques a été identifié. Il s'agit du récepteur « cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 » (CTLA-4). Ce récepteur présente une plus forte affinité pour les ligands B7-1 et B7-2 que le CD28, et induit un signal co-inhibiteur dans les lymphocytes T (Brunet et al. 1987; Rudd, Taylor, and Schneider 2009).

Plus récemment, d'autres molécules co-inhibitrices de la famille CD28 comme ICOS (inducible T-cell co-stimulator) et PD-1 (programed cell death-1) ont été identifiées. Ces molécules vont avoir un rôle important dans l'induction et maintenance de la tolérance (R. I. Nurieva, Liu, and Dong 2009). ICOS est exprimé sur les lymphocytes T activés, mais très peu sur les lymphocytes T naïfs au repos. Ce récepteur reconnaît le ligand « B7-related protein-1 » (B7RP-1 ou ICOSL) exprimé de façon constitutive par les lymphocytes B, monocytes et DCs. L'interaction d'ICOS avec son ligand est importante dans l'activation des lymphocytes T et dans la polarisation de la réponse T vers les Th1 et Th2. Ainsi, lors d'une réponse secondaire, ICOS joue également un rôle important dans la différentiation des cellules Th17 par l'induction de l'expression du récepteur à l'IL-23, et l'implication d'ICOS a été montrée dans la maintenance et l'homéostasie des cellules T régulatrices (Huang and Yang 2011a). PD-1 est un récepteur inhibiteur exprimé par les lymphocytes T CD4⁺/CD8⁺, par les NKT et certains sous-types de DCs. PD-1 a deux ligands, le PD-L1 et le PD-L2. L'interaction de PD-1 avec son ligand atténue la signalisation du TCR ce qui entraîne une suppression de la réponse lymphocytaire T (Huang and Yang 2011a).

Les voies de co-stimulation de B7-1/B7-2 : CD28/CTLA-4 sont les mieux caractérisées mais il existe également d'autres voies de co-stimulation supplémentaires. Par exemple, l'interaction du récepteur OX40 ou CD134 avec son ligand induit l'expansion et la survie des cellules T et permet également la réactivation des cellules T mémoires. En outre, cette interaction bloque l'activation des cellules T régulatrices ce qui favorise de façon indirecte la réponse immunitaire T (Croft et al. 2009).

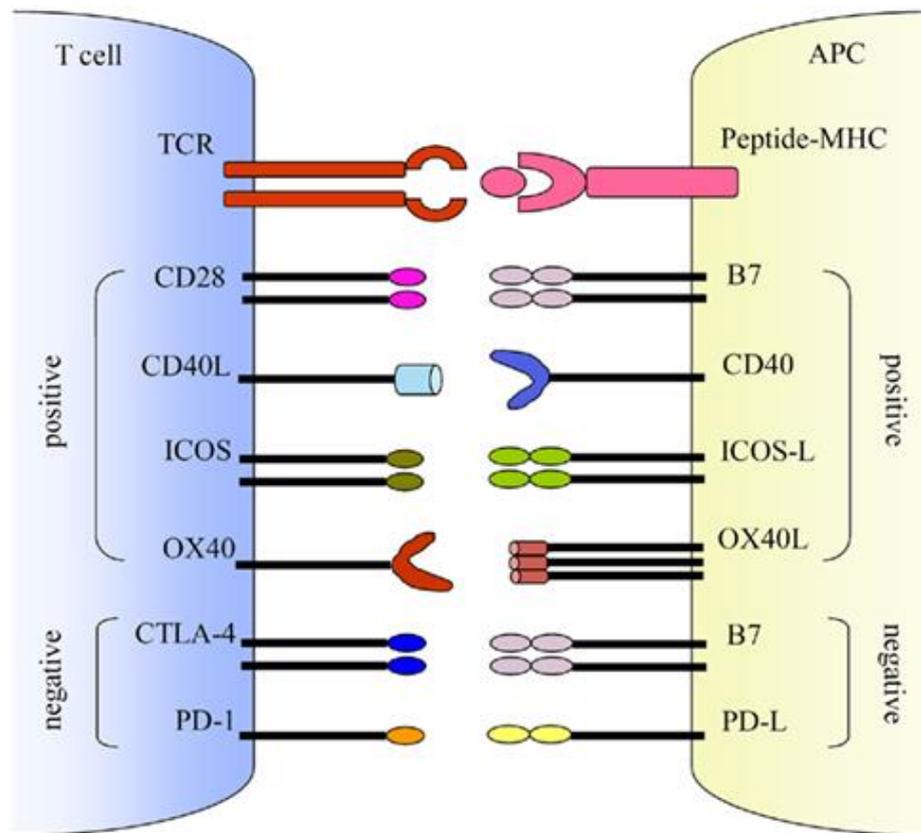


Figure 6. Molécules de co-stimulation positive ou négative.

D'après Huang and Yang (Huang and Yang 2011b).

4.1.5 Polarisation de la réponse lymphocytaire T effectrice

Les DCs intègrent différents signaux qui vont définir leur mode d'activation et par conséquent les fonctions effectrices induites dans les lymphocytes T de façon spécifique aux antigènes. Les différentes cellules T effectrices se distinguent par leur profil de production de cytokines et leur fonction et sont caractérisées par l'expression de facteurs de transcription (Figure 7).

Les lymphocytes T CD4⁺ naïves peuvent se différencier en lymphocytes T helper de différents sous-types comme les Th1, Th2, Th17 et Tfh (T follicular helper), et plus récemment il a été montré qu'ils pouvaient se différencier en Th9 (Dardalhon et al. 2008) et Th22 (Eyerich et al. 2009), alors que les cellules T CD8⁺ naïves vont se différencier en cellules T cytotoxiques (CTL).

Chez l'homme et la souris, la production d'IL-12 par les DCs activées et la production d'interféron- γ (IFN- γ) par les cellules NK favorisent la polarisation de la réponse T vers une réponse de type Th1. Ces Th1 vont alors exprimer le facteur de transcription « T-box expressed in T cell » (T-bet) et vont produire de l'IFN- γ (Szabo et al. 2000).

En présence d'IL-4, la réponse lymphocytaire T chez l'homme et chez la souris se dirige vers une réponse de type Th2 qui vont à leur tour exprimer le facteur de transcription « GATA-binding-factor 3 » (GATA-3) (Murphy and Reiner 2002) et produire des cytokines IL-4, IL-5, IL-10 et l'IL-13 (Le Gros et al. 1990; Swain et al. 1990).

Chez l'homme et chez la souris, la production des cytokines TGF- β et IL-6 sont responsables de la polarisation de la réponse lymphocytaire vers une réponse de type Th17. Les Th17 sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription « Retinoic acid receptor (RAR)-related Orphan Receptor γ isoform T » (ROR γ T), l'expression du récepteur de l'IL-23 et par la production des cytokines IL-17, IL-22 et IL-21 (Mangan et al. 2006). L'IL-21 participe à l'amplification des Th17 et peut également remplacer l'IL-6 pour contribuer aussi à la différenciation Th17 (R. Nurieva et al. 2007). L'IL-23 il a été montré comme responsable du maintien et de la survie des Th17 (Veldhoen et al. 2006).

Chez la souris, la différenciation de la réponse T vers les cellules Tfh est due à la production des cytokines IL-6 et IL-21. Ces cellules sont retrouvées dans les ganglions lymphatiques et elles expriment le facteur de transcription « B cell lymphoma 6 protein » (BCL-6) et le récepteur de chimiokines CXCR5 (R. I. Nurieva et al. 2009).

Les CTLs, à la différence des Ths, dérivent de l'activation des lymphocytes T CD8⁺ naïves via l'interaction du TCR avec les complexes CMH de class I/antigène et de façon dépendante des cellules Th1 (Ridge, Di Rosa, and Matzinger 1998). Ces cellules sont caractérisées par leur capacité cytotoxique en utilisant la voie FAS/FASL ou Granzyme B/Perforin ce qui permet la lyse des cellules ciblées (Kägi et al. 1994; Trapani and Smyth 2002).

Chaque sous-type de cellules effectrices entraîne l'expression de cytokines qui favorisent leur expansion et leur différenciation et inhibent la polarisation de la réponse T vers les autres sous-types. Cependant plusieurs études montrent l'existence

d'une plasticité entre ces différents sous- types. Par exemple, chez la souris, en absence de TGF- β , les cellules Th17 peuvent dériver en Th1 sous l'influence de l'IL-12 et de IL-23 (Y. K. Lee et al. 2009). De plus, les Th2 peuvent dériver en Th1 lors d'une infection virale en exprimant le facteur de transcription T-bet et en produisant de l'IFN- γ (Hegazy et al. 2010).

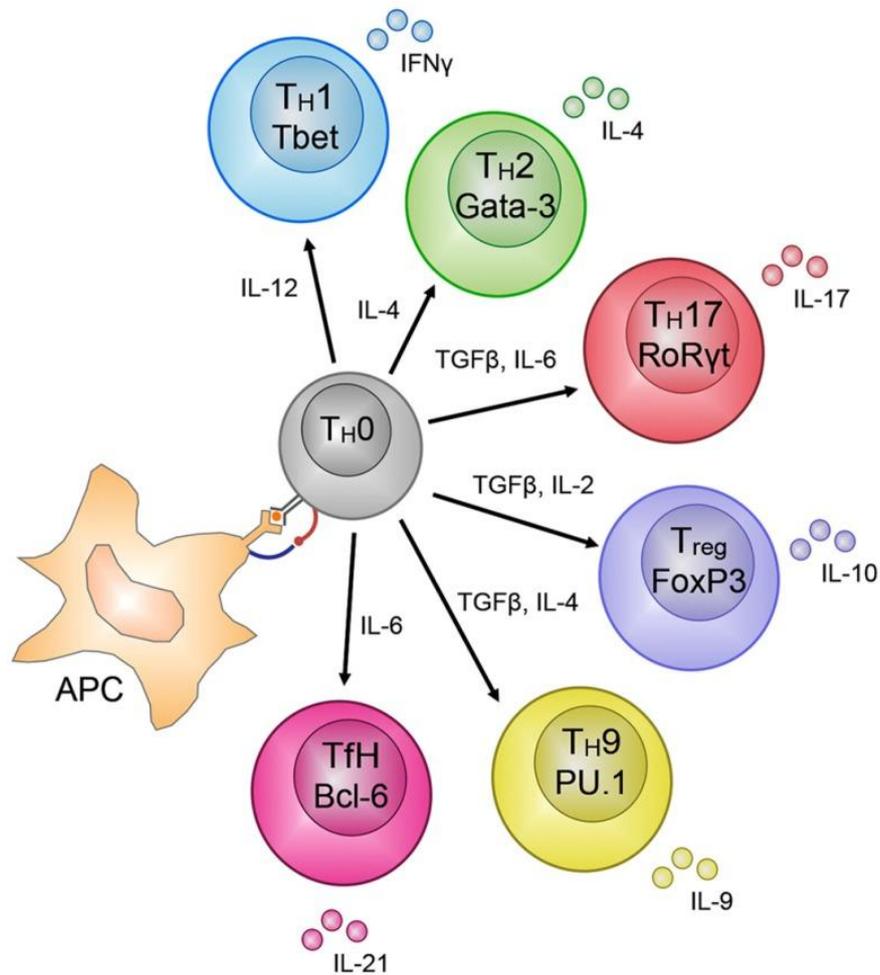


Figure 7. Différenciation des lymphocytes T CD4⁺.

D'après Russ et al. (Russ et al. 2013).

4.2 Spécialisation des différents sous-types des DCs dans l'activation des lymphocytes T

Plusieurs modèles de déplétion sélective de certains sous-types de DCs ont été mis en place afin d'étudier leurs contributions dans la réponse immunitaire. L'ensemble des études fonctionnelles et ontogéniques ont montré que les DCs CD8⁺ résidant dans les organes lymphoïdes et les DCs CD103⁺ résidant dans les organes non-lymphoïdes ont une même origine et montrent un phénotype et un profil transcriptionnel et fonctionnel similaire. Cependant, les DCs CD11⁺ restent séparées des DCs CD8⁺ et CD103⁺ en ce qui concerne leurs profils de transcription et leurs fonctionnalités.

4.2.1 Activation des lymphocytes T CD4⁺

Jusqu'à aujourd'hui le rôle des DCs CD8⁺ et DCs CD103⁺ dans l'activation des lymphocytes T CD4⁺ reste controversé dans la littérature.

Un étude a montré que les DCs CD8⁺ spléniques sont les principales cellules productrices de la cytokine IL-12 impliquée dans la polarisation Th1 (Maldonado-López et al. 1999; Farrand et al. 2009). En outre, il a été montré que les DCs CD103⁺ localisées au niveau dermal contrôlent l'induction de cellules T CD4⁺ IFN- γ ⁺ spécifiques de pathogènes après une infection cutanée avec *Candida albicans* (Igyártó et al. 2011). Récemment, des souris transgéniques ont été créées pour exprimer le « diphtheria toxin receptor » (DTR) sous le promoteur du récepteur lectin de type-C Langerin. Pour évaluer directement le rôle fonctionnel des cellules Langerin⁺CD11b⁻CD103⁺ dans le développement des cellules Th17 et Th1 dans un contexte d'encéphalomyélite auto-immune, l'équipe de Benjamin M. Segal ont généré des souris (CD45.1) chimères par irradiation létale et transfert de la moëlle osseuse de souris transgéniques Langerin-DTR CD45.2. L'administration du « diphtheria toxin » (DT) chez les souris chimères permet donc l'élimination spécifique des DCs CD103⁺. Cette étude a mis en évidence que l'élimination de ces DCs CD103⁺ dermiques protège les souris d'une encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) dépendant de la réponse Th1 (King, Kroenke, and

Segal 2010). Ces études montrent donc, l'implication des DCs CD8⁺ et CD103⁺ dans l'activation des cellules T CD4⁺ entraînant plus particulièrement une réponse Th1.

En revanche, d'autres études ont montré que ces DCs n'ont aucun rôle dans l'activation des cellules T CD4⁺. Par exemple, chez les souris déficientes en « basic leucine zipper transcription factor ATF-like 3 » (Batf3) (facteur de transcription essentiel pour le développement des DCs CD103⁺ et CD8⁺) et par conséquent déficientes en DCs CD103⁺ et CD8⁺, une étude a montré une réponse efficace de la part des lymphocytes CD4⁺ activés par des immunogènes tumoraux (fibrosarcome) ou viraux (Virus West Nile) (Hildner et al. 2008). Egalement dans ce modèle, la réponse Th1 spécifique à la glycoprotéine de la myéline des oligodendrocytes n'a pas été affectée suite à une immunisation sous-cutanée, entraînant une EAE sévère (Edelson et al. 2011). De plus, l'élimination des DCs CD103⁺ chez les souris transgéniques Langerin-DTR par l'administration du DT 7 jours avant l'infection n'a pas modifié la réponse efficace des cellules T CD4⁺ contre le trypanosome *Leishmania major* (Brewig et al. 2009).

Ces études controversées suggèrent un rôle des DCs CD8⁺ et CD103⁺ dans l'activation de la réponse T CD4⁺ dépendante des différents ligands.

Cependant, le rôle des DCs CD11b⁺ dans l'activation des lymphocytes T par la présentation antigénique via le CMH de classe II semble plus claire. Il a été montré que les DCs CD11b⁺ spléniques expriment plus fortement les gènes codant pour protéines impliquées dans la voie antigénique du CMH-II par rapport aux DCs spléniques CD8⁺ (Dudziak et al. 2007). En outre, ces cellules montrent *in vivo* une meilleure efficacité dans l'activation des lymphocytes T CD4⁺ via le CMH de classe II que les DC CD8⁺ à l'état d'équilibre (Dudziak et al. 2007; Idoyaga et al. 2008). Egalement, après une infection virale par l'HSV-1 ou le virus Influenza A, il a été montré *ex vivo* que les DCs CD11b⁺ migratoires présentent des antigènes viraux principalement aux lymphocytes CD4⁺ (Bedoui et al. 2009; Kim and Braciale 2009). De plus, après immunisation sous-cutanée avec des combinés d'antigènes et adjuvants, les DCs CD11b⁺ localisées au niveau dermal ont la capacité d'attirer et accumuler des lymphocytes CD4⁺ effecteurs et régulateurs (Kastenmüller et al. 2011; McLachlan et al. 2009a).

4.2.2 Activation des lymphocytes T CD8⁺

A partir de la purification des DCs suite à une immunisation chez les souris, plusieurs études *ex vivo* ont montré la capacité supérieure des DCs CD8⁺ et CD103⁺, par rapport aux autres DCs, pour présenter des antigènes microbiens ou des antigènes associés aux cellules elles-mêmes aux lymphocytes T CD8⁺ (Bedoui et al. 2009; Belz et al. 2007; Henri et al. 2010).

Certains modèles de déplétion des DCs CD103⁺ et CD8⁺ ont été mis en place. L'élimination des DCs CD103⁺ du poumon et des DC CD8⁺ lymphoïdes, a révélé *in vivo*, le rôle de ces DCs dans l'induction des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du virus Influenza A, et du parasite *Leishmania major* (Brewig et al. 2009; GeurtsvanKessel et al. 2008). Egalement, chez les souris Langerin-DTR déficientes en DCs CD8⁺ et CD103⁺, il a été montré leur incapacité à une réponse T cytotoxique suite à l'immunisation sous-cutanée avec le virus West Nile, ou suite à une infection pulmonaire avec le virus Influenza (Hildner et al. 2008; Helft et al. 2012). Ces modèles ont ainsi établi le rôle des cDCs CD8⁺ et CD103⁺ dans l'activation de la réponse lymphocytaire CD8⁺ *in vivo*. Cette activation peut être dépendante ou indépendante de la cross-présentation.

En effet, les cDCs CD8⁺ et CD103⁺ présentent un fort potentiel à cross-présenter les Ag. Par exemple, il a été montré que les cDCs CD8⁺ spléniques expriment fortement Rac2, une GTPase qui aide à maintenir les phagosomes alcalins, ce qui limite l'activité protéase. Ce fait favorise la libération des antigènes exogènes au cytosol qui vont ensuite être cross-présentés aux cellules T (Savina et al. 2009). Egalement, l'activation des cDCs CD8⁺ augmente l'expression d'Irgm 3, une molécule impliquée dans la formation de l'adiposome qui comporte une source de stress oxydative ce qui déstabilise les membranes des phagosomes permettant la libération des antigènes dans le cytosol (Bougnères et al. 2009).

Les cDCs CD8⁺ et CD103⁺ sont également importantes dans l'activation des cellules T CD8⁺ indépendamment de leur potentiel de cross-présentation. Par exemple, les cDCs CD8⁺ expriment plus de gènes liés à la présentation du CMH de classe I que les cDCs CD11b⁺ (Dudziak et al. 2007). Elles sont également la principale source d'IL-12 et IL-15, deux cytokines impliquées dans la différenciation des lymphocytes T CD8⁺

cytotoxiques (Hochrein et al. 2001; Mashayekhi et al. 2011; Mattei et al. 2001). De plus, les cDCs CD8⁺ et CD103⁺ sont les seules cellules hématopoïétiques qui expriment le récepteur de chimiokine XCR1. Ce récepteur reconnaît le ligand XCL1 exprimé à la surface des lymphocytes T CD8⁺ au moment de la présentation antigénique permettant sa différenciation en lymphocytes T cytotoxiques (Dorner et al. 2009).

En ce qui concerne les DCs CD11b⁺, plusieurs études suggèrent un rôle aussi de ces cellules dans l'activation de lymphocytes T CD8⁺. Par exemple, les cDCs CD11b⁺ provenant des souris immunisées avec des virus, sont capables d'activer les lymphocytes T CD8⁺ mais les mécanismes de présentation n'ont pas été déterminés. Les cDCs CD11b⁺ pourraient cross-présenter des antigènes associés aux cellules-mêmes infectées, ou bien présenter de façon directe les antigènes viraux aux T CD8⁺ (Kim and Braciale 2009; Kastenmüller et al. 2011).

5. Cellules dendritiques dans la tolérance

5.1 Tolérance centrale

Les lymphocytes T se développent dans le thymus à partir de précurseurs provenant de la moelle osseuse. Le réarrangement des gènes de leur TCR se produit lors de ce développement. Le répertoire lymphocytaire final est défini suite à une sélection positive puis négative qui permet la survie des lymphocytes T fonctionnels et tolérants aux peptides du soi.

Les sélections positive et négative sont deux des mécanismes très importants de la tolérance centrale. Les cellules épithéliales localisées au niveau du cortex thymique (cTEC) et au niveau médullaire (mTEC) et les cellules dendritiques (tDC) sont essentielles dans ces mécanismes. La sélection positive est un processus qui permet de conserver les thymocytes capables de reconnaître via leur TCR un peptide associé à une molécule CMH du soi (Fink and Bevan 1978). La sélection négative permet ensuite d'éliminer les cellules T qui reconnaissent fortement les antigènes du soi par leur TCR. La sélection négative peut être effectuée par les mTEC, mais ce sont les cellules dendritiques présentes dans les thymus qui apparaissent comme les principaux acteurs de cette sélection (Anderson, Partington, and Jenkinson 1998).

Les DCs du thymus (tDC) peuvent présenter des antigènes provenant de différentes sources. Ces cellules acquièrent des antigènes dérivés des mTEC qui peuvent être des auto-antigènes de restriction tissulaire exprimés sous le contrôle de AIRE (gène régulateur de la transcription) ou des antigènes provenant de leur membrane, noyau ou cytosol (Koble and Kyewski 2009). Les tDCs acquièrent aussi des antigènes du sang présents dans l'espace périvasculaire au niveau de la zone cortico-médullaire et autour des petits vaisseaux (Baba, Nakamoto, and Mukaida 2009). Egalement, ces cellules peuvent présenter des antigènes provenant des tissus périphériques après migration par la circulation sanguine jusqu'à au thymus (Bonasio et al. 2006), (Hadeiba et al. 2012). Cette énorme variabilité au niveau de la présentation d'antigènes rend les tDCs essentielles dans la sélection négative et donc dans la tolérance centrale.

Un troisième mécanisme s'ajoute aux mécanismes de sélections positive et négative. Celui-ci consiste à générer des lymphocytes T régulateurs dans le thymus dits naturels (nTreg). Ces lymphocytes expriment fortement la chaîne α du récepteur de l'IL-2 (CD25) ainsi que le facteur de transcription FoxP3 (Sakaguchi et al. 1995). Bien qu'ils aient été décrits comme provenant des lymphocytes doubles-positives, les nTregs semblent être dérivés des lymphocytes T CD4⁺ sélectionnés positivement (Bensinger et al. 2001; Liston et al. 2008; H. M. Lee and Hsieh 2009).

Les mTEC et les tDCs jouent un rôle très important dans la génération des nTregs. Ces cellules vont favoriser l'expression de FoxP3 par leurs précurseurs de façon dépendante de la protéine « Thymic stromal lymphopoietin » (TSLP). La TSLP est exprimée dans les corpuscules de Hassal constitués de mTEC groupés. Cette protéine induit la maturation des tDCs par l'augmentation des molécules co-stimulatrices CD80 et CD86 (Watanabe et al. 2005). Il a été montré l'importance de la reconnaissance de CD28 exprimé à la surface des thymocytes par le CD80 et CD86 pour la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en nTregs (Salomon et al. 2000a). Egalement l'interaction entre le CD27 (membre des récepteurs du facteur de nécrose tumorale) exprimé par le tDC avec son ligand CD70 présenté par les thymocytes (Coquet et al. 2013) et la sécrétion des cytokines l'IL-2, IL-7 et IL-15 semblent importants au développement des nTregs (Fontenot et al. 2005; Lio and Hsieh 2008). Ces lymphocytes régulateurs vont

donc migrer ensuite vers les organes lymphoïdes secondaires et d'autres organes comme le foie et la peau, et vont jouer un rôle crucial dans les mécanismes de tolérance périphériques.

5.2 Tolérance périphérique

Bien que la sélection thymique élimine efficacement de nombreux lymphocytes T auto-réactifs, certains échappent à cette sélection et doivent être contrôlés par des mécanismes de tolérance périphérique supplémentaires. Les rôles de ces mécanismes sont non seulement d'empêcher la réponse auto-immune mais également de limiter les réponses immunitaires trop intenses contre des antigènes étrangers.

En l'absence d'inflammation, les DCs peuvent présenter des auto-antigènes aux cellules T, mais l'activation de ces derniers ne sera pas optimale étant donné l'absence d'un signal de co-stimulation fort, conduisant à l'anergie (en l'absence du deuxième signal de co-stimulation) ou à la suppression de ces cellules T (Hawiger et al. 2001). La tolérance périphérique médiée par les DCs est donc un processus actif qui nécessite l'utilisation de la voie de signalisation du TCR. La suppression clonale des cellules T a lieu via l'activation de l'apoptose dépendante à Fas, Bim ou TNF- α , et via l'inhibition de la voie de signalisation du NF κ B (Hutcheson et al. 2008; Hughes et al. 2008; Ohi et al. 2004).

L'état de maturation des DCs et leur capacité de présentation des Ag contribuent à l'équilibre entre tolérance et immunité (Wallet, Sen, and Tisch 2005; George et al. 2003). A l'équilibre, les DCs sont exposées aux microorganismes commensaux de façon constante. Dans ces conditions, ces cellules expriment leurs marqueurs de maturation à des niveaux faibles ce qui leur permet d'avoir des propriétés tolérogènes. Une fois activées par un agent pathogène ou par des molécules endogènes associées aux dommages cellulaires, les DCs initient un programme de transcription génique, métabolique et cellulaire particulier permettant leur migration des tissus périphériques vers les ganglions lymphatiques où se produit la présentation de l'Ag aux cellules T. La maturation est marquée par une augmentation de l'expression de molécules permettant l'activation des lymphocytes T

comme le CMH-II, des molécules de co-stimulation telles que CD40, CD80 et/ou CD86 et les cytokines et chimiokines impliquées dans l'inflammation.

Cependant, certaines de ces molécules co-stimulatrices peuvent être impliqués aussi dans la tolérance en fonction du ligand d'interaction. Par exemple, l'interaction de CD80/CD86 avec le CTLA4 induit la tolérance des lymphocytes T CD8⁺ périphériques (Probst et al. 2005). De plus, de manière importante, les molécules co-stimulatrices CD80 et CD86 sont nécessaires également pour la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en lymphocytes T régulateurs cruciaux pour la tolérance (Salomon et al. 2000b; Zheng et al. 2004; Yamazaki et al. 2003). Par conséquent, les DCs immunogènes ou tolérogènes devraient idéalement être définies en fonction des signaux qu'elles donnent et qui conduisent les cellules T vers la tolérance ou l'immunité, et non en fonction de leur état de maturation.

5.3 Spécialisation dans la tolérance des différents sous-types de DCs

5.3.1 DCs CD8⁺/CD103⁺

Plusieurs études sur la fonctionnalité de ces sous-types de DCs ont montré un rôle majeur dans la cross-présentation des antigènes et donc dans l'activation de lymphocytes CD8⁺. Mais aussi, et de façon très importante, en absence d'inflammation, ces sous-types de DCs jouent un rôle dans la génération des lymphocytes T régulateurs (Tregs) et dans la médiation de la tolérance (Merad et al. 2013c; Hsieh, Lee, and Lio 2012). Il a été montré que les cDCs CD8⁺ ont une habilité beaucoup plus importante à l'induction des Tregs par rapport aux cDCs CD8⁻ grâce à leur capacité à produire le TGF- β (Wang et al. 2008; Yamazaki et al. 2008). En outre, l'équipe d'Alexander H. Enk a montré *in vivo* que ces cellules ont la capacité d'induire des Tregs périphériques (iTreg). Dans cette étude, des Ac spécifiques des récepteurs d'endocytose tels que les récepteurs lectin de type C (DEC-205 ou DNGR-1) couplés à l'OVA ont été injectés chez les souris Balb/c reconstituées avec des cellules T DO11.10 (spécifiques à l'OVA). Les anticorps couplés à l'OVA seront donc phagocytés par les DCs via ces récepteurs et présentés ensuite aux LT DO11.10. La capacité suppressive des Tregs purifiés suite à l'immunisation a été testée *in vitro* à différentes doses dans une

MLR. Cette étude a montré que les Tregs dérivés de souris immunisées avec l'Ac anti-DEC-205-OVA ou anti-DNGR-1-OVA sont activés *in vivo* et ont un effet suppressif de manière non-spécifique à l'antigène (Mahnke et al. 2003; Joffre et al. 2010). De plus, les DCs CD8⁺ et CD103⁺ liées aux tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT) ont également un rôle très important dans la tolérance par l'induction de la différenciation de novo des Tregs de manière dépendante du TGF- β et de l'acide rétinoïque (Coombes et al. 2007).

Bien que les sous-types de DCs aient un rôle important dans l'induction des Tregs, ce rôle n'est pas exclusif. Il a été montré que la déficience en DCs CD8⁺ et CD103⁺ chez la souris, ne modifie pas les niveaux des Tregs intestinaux, ce que suggère la présence d'autres cellules présentatrices d'antigènes impliquées aussi dans la génération de Tregs (Edelson et al. 2010).

(Tableau 2)

5.3.2 DC CD11b⁺

Le rôle des DCs CD11b⁺ dans la tolérance a été difficilement identifié. Quelques études ont montré leur capacité à réguler l'homéostasie des Tregs dans la peau. Sous conditions inflammatoires les DCs CD11b⁺ de la peau induisent les lymphocytes T FoxP3⁺ (McLachlan et al. 2009b; Williams et al. 2010). Cependant, l'élimination sélective des DCs CD11b⁺ chez la souris ne modifie pas la fréquence des Tregs, ce qui indique que ces cellules peuvent être suffisantes mais ne sont pas nécessaires pour l'homéostasie des Tregs (Lewis et al. 2011b).

(Tableau 2)

5.3.3 pDCs

Bien que l'implication des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) dans la présentation des antigènes aux lymphocytes T soit un sujet de discussion, il semblerait que la présentation d'antigènes par le CMH de classe II par les pDC favorise l'expansion des Tregs et donc la protection à l'encéphalomyélite auto-immune (EAE). Le gène codant pour la protéine « class II, major histocompatibility complex, transactivator »

(CIITA), qui régule l'expression du CMH de classe II au niveau qualitatif et quantitatif, est sous le contrôle de promoteurs spécifiques du type cellulaire (pI, pIII et pIV). Le pIII permet son expression dans les pDCs alors que le pI est spécifique des cDCs et le pIV est spécifique des TECs. Cette spécificité a permis la création et l'utilisation de souris chimères pIII+pIV^{-/-}:WT (souris WT irradiées de façon létale et reconstituées avec la moelle osseuse de souris pIII+pIV^{-/-}) pour étudier le rôle de la présentation d'antigènes à travers le CMH de classe II par les pDCs. Cette étude a démontré que les souris déficientes pour le CMH de classe II spécifiquement dans les pDCs développent l'EAE de manière exacerbée. Après l'induction de l'EAE, les pDCs sont recrutées dans les ganglions lymphatiques et établissent la présentation de l'antigène « myelin oligodendrocyte glycoprotein » (MOG) aux lymphocytes T CD4⁺. Cette interaction induit la prolifération sélective des lymphocytes Tregs spécifiques de MOG qui vont supprimer la réponse T CD4⁺ auto-immune (Irla et al. 2010). En outre, l'équipe de Jordi C. Ochoa a montré que les cellules jouent un rôle dans la tolérance à l'allogreffe cardiaque vascularisée par l'intermédiaire des Tregs. Les pDCs tolérants acquièrent les antigènes dans l'allogreffe et migrent ensuite vers les ganglions lymphatiques pour présenter les alloantigènes et induire la génération de cellules Tregs (CCR4⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺). Cette étude démontre que la déplétion des pDCs a inhibé le développement des cellules Tregs périphériques et l'induction de la tolérance, alors que le transfert adoptif des pDCs tolérogènes induit un développement de Tregs et une survie prolongée du greffon (Jordi C. Ochoa et al. 2006).

Egalement, plusieurs études *in vitro* ont montré que les pDC humaines peuvent être utilisées comme outils pour l'induction de Tregs. Les pDC résidant du thymus ont la capacité *ex vivo* d'induire la génération de Tregs (Martín-Gayo et al. 2010) tout comme les pDCs isolées du sang (Moseman et al. 2004).

(Tableau 2)

Induction des lymphocytes Tregs par les DCs	
cDCs CD8 ⁺ souris cDCs 103 ⁺ souris	Différenciation de novo des Tregs de manière dépendante du TGF-β
CD11b ⁺ souris (peau)	Régulation de l'homéostasie des Tregs
pDCs souris pDCs humaines (Résidant du thymus et isolées du sang)	Induction de la génération des Tregs

Tableau 2. Induction des lymphocytes Tregs par les DCs.

5.4 DCs tolérogènes en transplantation

5.4.1 Rejet de greffe

Aujourd'hui, la transplantation constitue un traitement thérapeutique très efficace pour remplacer le dysfonctionnement d'organes vitaux. Ils existent différents types de greffes définies par le degré d'identité génétique entre le donneur et le récepteur : les greffes syngéniques, réalisées entre individus génétiquement identiques, les greffes allogéniques, réalisé entre individus génétiquement différents mais de la même espèce, et la xénogreffe réalisée entre espèces différentes.

A l'heure actuelle, les greffes allogéniques sont les plus communes en transplantation. Le système immunitaire du receveur, qui est capable de distinguer le « soi » du « non soi », entraîne une réponse immunitaire qui vise à détruire les organes provenant des individus génétiquement différents.

Dans le cadre du rejet d'allogreffe, deux mécanismes immunologiques principaux ont été décrits : une réponse innée non spécifique, avec des signaux pro-inflammatoires qui jouent un rôle important; et une réponse adaptative liée à la présentation des antigènes du donneur aux cellules T naïves alloréactives au niveau des ganglions lymphatiques, et donc à l'induction de cellules T effectrices qui, en retour, migrent vers la greffe. Ils existent trois voies de présentation d'alloantigènes différentes (J. C. Ochando, Krieger, and Bromberg 2006; Afzali, Lombardi, and Lechler 2008):

- Directe. Après la transplantation, les DCs du donneur sont activées au sein du greffon par des signaux pro-inflammatoires comme l'IL1-β, le TNF-α et le CD40. Ces DCs vont migrer ensuite vers les organes lymphoïdes drainants où ils vont

présenter les antigènes du donneur via le CMH de classe I et II aux lymphocytes T naïfs. Il existe donc, des lymphocytes T capables de reconnaître par mimétisme moléculaire des CMHs du non soi de façon dépendante ou non des peptides.

- Indirecte. Les DCs du donneur peuvent migrer très rapidement du greffon vers les organes lymphoïdes drainants où ils meurent. Ces cellules vont être, une source d'alloantigènes pour les cellules présentatrices d'antigènes (APCs) du receveur, notamment les DCs, qui vont capter, traiter et présenter les antigènes par le CMH de classe II aux cellules T CD4⁺.
- Semi directe. Dans cette voie les APCs du receveur acquièrent des complexes CMH-peptides provenant des APCs du donneur par contact direct entre les cellules, ou à travers l'absorption de vésicules appelées exosomes libérées au niveau extracellulaire. Cette voie permet à la fois l'activation des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺.

Trois types différents de rejet sont décrits dans la littérature :

- Le rejet hyper-aigu (quelques minutes ou quelques heures après la greffe) caractérisé par la présence des anticorps spécifiques des antigènes du sang ABO ou des antigènes du CMH du donneur qui vont se fixer aux cellules endothéliales du greffon et les lyser de manière dépendant du complément.
- Le rejet aigu (dans les premiers jours après la greffe) caractérisé par une réponse cellulaire principalement due aux lymphocytes T, lié à la présentation directe et indirecte (Lechler and Batchelor 1982) et également à la réponse humorale (Sayegh and Colvin 2003) par activation du complément (Pratt, Basheer, and Sacks 2002), ou des anticorps spécifiques d'antigènes du donneur (Brändle et al. 1998).

- Le rejet chronique (des mois à des années après la greffe) caractérisé par une perte progressive de la fonctionnalité du greffon lié à l'artériosclérose des vaisseaux sanguins et à une fibrose du parenchyme du greffon (Libby and Pober 2001). Plusieurs facteurs sont impliqués dans ce rejet, mais les mécanismes ne sont pas encore bien définis.

Des traitements immunosuppresseurs ont été mis en place. Ils sont capables de contrôler le rejet aigu mais sont beaucoup moins efficaces sur le rejet chronique. La recherche d'autres mécanismes thérapeutiques capables de contrôler le rejet de greffe ouvre un nouvel axe où plusieurs études basées sur l'application de DCs tolérogènes ont été mis en place.

5.4.2 Génération des DCs tolérogènes *ex vivo* et leur potentiel thérapeutique.

Dans la littérature plusieurs propriétés des DCs tolérogènes générées *ex vivo* ont été décrites. Ces cellules présentent une faible expression du CMH, des molécules de co-stimulation CD80 et CD86, et du marqueur d'activation CD40. Elles sont également résistantes à la maturation et ont un faible potentiel d'activation des cellules T naïves. En revanche, elles expriment très fortement l'IL-10 et éventuellement favorisent la prolifération des lymphocytes Tregs (Moreau et al. 2016).

Elles sont générées à partir des monocytes sanguins CD14⁺ chez l'homme, des précurseurs de la moelle osseuse chez le rongeurs, et des cellules CD34⁺ chez les primates non humains (Moreau et al. 2016). Ces précurseurs sont cultivés en présence de GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) à faible dose (Lutz et al. 2000), et éventuellement avec l'IL-4, l'IL-10 et le TGF- β (Torres-Aguilar et al. 2010), ou des drogues comme la vitamine-D3, la rapamycine, ou le dexaméthasone (Penna and Adorini 2000; Turnquist et al. 2007; Woltman et al. 2000). Les DCs traitées avec de la Vit-D3 empêchent par exemple le « priming » de des cellules T et induisent l'apoptose des cellules T effectrices (Nikolic and Roep 2013). Ces cellules favorisent également l'induction de cellules T régulatrices spécifiques de l'antigène via la

rééducation des DCs matures pro-inflammatoires en DCs ayant des propriétés immunomodulatrices (Kleijwegt et al. 2011).

Il existe d'autres alternatives génétiques pour la génération des DCs tolérogènes *ex-vivo*, comme l'utilisation des oligonucléotides antisens dirigés contre les gènes codant pour le CD40, le CD80 et le CD86. Dans un modèle de diabète chez la souris, le transfert de DCs traitées avec ces oligonucléotides confère une protection contre le diabète en induisant la prolifération et la survie des cellules Tregs (Machen et al. 2004).

Chez l'animal plusieurs modèles de transplantation ont été mis en place dans le but de tester le potentiel thérapeutique des DCs tolérogènes. Dans un premier temps, il a été montré que le transfert de progéniteurs des DCs provenant du donneur prolongeait la survie du greffon chez les receveurs dans un modèle d'allogreffe cardiaque hétérotopique chez la souris (Fu et al. 1996). Chez les primates, nombreuses études ont montré également leur potentiel thérapeutique dans des modèles de transplantation. Par exemple, chez le macaque, le transfert de DCs dérivées à partir de monocytes du donneur et en présence de VitD3 et IL-10 une semaine avant une greffe rénale prolonge la survie du greffon (Ezzelarab et al. 2013). Cependant, il a été montré chez la souris, la supériorité des DCs tolérogènes dérivés du propre receveur pour prolonger la survie de l'allogreffe cardiaque par rapport aux DCs tolérogènes dérivés du donneur (Pêche et al. 2005).

Chez l'homme, plusieurs essais cliniques ont testé les effets de l'administration des DCs tolérogènes autologues chez des patients souffrant de maladies auto-immunes. Aucun effet secondaire majeur n'a été rapporté après l'administration des DCs tolérogènes par voie intradermique chez des patients souffrant de diabète de type I (Giannoukakis et al. 2011), ou par voie intrapéritonéale chez des patients présentant une maladie de Crohn (Jauregui-Amezaga et al. 2015). Dans le contexte de la transplantation, notre équipe fait parti du consortium européen « ONE Study » afin d'évaluer la sécurité et la faisabilité (essai clinique phase I et II) de l'utilisation des DCs tolérogènes autologues (ATDC) en transplantation rénale.

II. C-type lectin receptors

1. Généralités et structure

Les « C-type Lectins Receptors » (CLR) ont été originalement définis comme une famille de récepteurs solubles et transmembranaires caractérisés par la reconnaissance des carbohydrates par leur domaine extracellulaire, le « carbohydrate recognition domain » (CRD). Le CRD est un motif d'acides aminés avec une structure très conservée. Ces acides aminés forment deux boucles protéiques stabilisées par deux ponts disulfures à la base de chaque boucle. La liaison entre les cystéines 1 et 4 permet la formation de la première boucle, le « whole domain loop », alors que la liaison entre les cystéines 2 et 3 permet la formation d'une deuxième boucle, le « long loop region », qui est plus flexible et contient le site de liaison aux ligands (Zelensky and Gready 2005) (Figure 8).

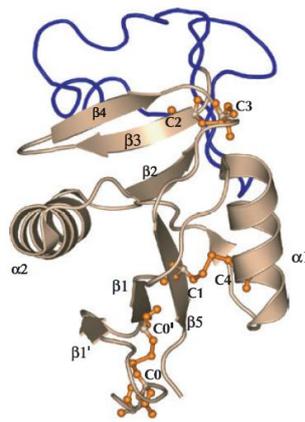


Figure 8. Structure du domaine CRD.

D'après Zelensky and Gready (Zelensky and Gready 2005).

Cette structure comprend 4 sites de fixation du calcium (Ca^{2+}), mais c'est le site 2 qui est important dans la reconnaissance du carbohydrate (Figure 9). Ce site contient 2 acides aminés avec des chaînes latérales carbonyles qui, en présence du calcium, forment une liaison hydrogène avec des monosaccharides spécifiques. Par exemple, le motif « EPN » (Glu-Pro-Asn) est spécifique des ligands composés de mannose, tandis que le motif « QPD » (Gln-Pro-Asp) est spécifique des ligands composés de galactose (Zelensky and Gready 2005).

II. C-type lectin receptors

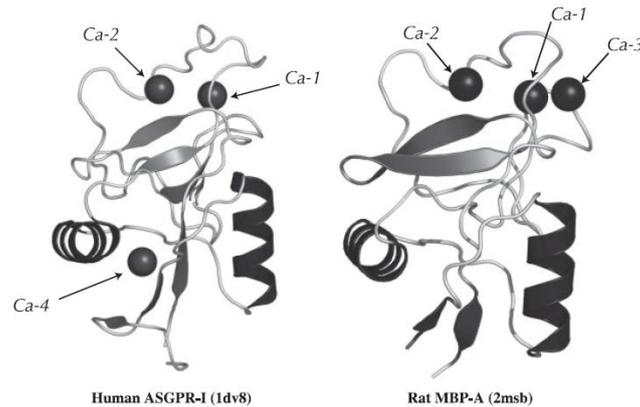


Figure 9. Structure du domaine CRD.

D'après Zelensky and Gready (Zelensky and Gready 2005).

Des domaines homologues aux CRD, capables de reconnaître des molécules comme les lipides ou des protéines autres que des carbohydrates, ont aussi été mis en évidence. Ces domaines sont connus comme étant des « C-type lectin-like domains » (CTLDs) et font partie des « C-type lectin-like receptors » (CTLRs) (Zelensky and Gready 2005).

Au cours de l'année 1993, Drickamer a classé les CTLRs connus jusqu'à présent en 7 groupes (I - VII) différents. Dans les années 2000, la classification a été actualisée avec l'addition de 10 groupes supplémentaires (VIII – XVII). Cette classification est basée sur la systématique phylogénique ou sur l'architecture des protéines qui contiennent les CTLD, et est un outil très important pour l'étude de l'évolution des CTLD (Zelensky and Gready 2005) (Tableau 3).

Group	Structural description
I Lecticans	Large extracellular proteoglycans containing mainly chondroitin sulfate side chains. Historically divided into three globular domains (N-terminal G1 and G2, and a C-terminal G3) and a central extended region to which glycosaminoglycan chains are attached. G1 and G2 contain 2–4 Link type CTLDs, while G3 contains a canonical CTLD.
II Asialoglycoprotein and DC receptors	Type II transmembrane proteins containing a short cytoplasmic tail, a transmembrane domain, an extracellular stalk region, and Ca ²⁺ /carbohydrate binding CTLD. Length of stalk region, involved in oligomerization, varies greatly among different members. Large and heterogeneous group, significantly expanded recently.
III Collectins	Soluble CTLDcps that contain a collagen domain and function as the first line of the innate immune defense.
IV Selectins	Type I transmembrane proteins containing CTLD, EGF and 2–9 complement control protein (CCP) domains.

II. C-type lectin receptors

Group	Structural description
V 'NK – cell receptors'	Non-Ca ²⁺ -binding type II transmembrane CTLDcps. Despite the common group definition of 'type II NK cell receptors', many are not (exclusively) expressed by NK cells: CD72 is expressed on B-cells; CD69 on various hematopoietic cells; KLRG1/MAFA on basophils and NK cells; LOX-1 on vascular endothelial cells; DCAL1, CLEC-1, KLRL1 on dendritic cells; Dectin-1 on macrophages and dendritic cells; MDL-1 exclusively on monocytes and macrophages; and CLEC-2 in liver.
VI Multi-CTLD endocytic receptors	Type I transmembrane proteins with an N-terminal ricin-like domain, a fibronectin type 2 domain and 8 or 10 (Dec205) CTLDs in the extracellular domain, and a short cytoplasmic domain.
VII Reg group	CTLD preceded by a short N-terminal peptide. In the initial classification this group included all other soluble single-CTLD proteins.
VIII Chondrolectin, Layilin	Type I transmembrane proteins with a single CTLD.
IX Tetranectin	Soluble proteins with a long N-terminal α -helical domain involved in coiled-coil formation. This structure resembles the structure of the C-terminal domain of collectins. SCGF also contains an N-terminal mucin-like Ser/Thr rich region.
X Polycystin 1	Large multidomain protein with 11 membrane-spanning regions, thought to be involved in cell-cell or cell-matrix interactions. The extracellular domain of PKD1 is 3000 amino acids long and contains 16 PKD domains, which have an Ig-like fold, a leucine-rich repeat domain, a putative carbohydrate-binding WSC domain, a CTLD and a domain homologous to the sea urchin receptor egg jelly protein 1 (suREJ1).
XI Attractin	Glycoprotein expressed in transmembrane or soluble form due to alternative splicing; contains a CUB domain (found in many developmentally regulated proteins), four EGF-like domains, and four PSI domains (found in plexins, semaphorins and integrins).
XII Eosinophil major basic protein (EMBP)	Soluble protein containing a highly basic CTLD and an acidic pro-peptide, which is cleaved off in the active form.
XIII DGCR2	Type I transmembrane protein containing vWF, CTLD and LDL domains in extracellular region.
XIV Thrombomodulin	Type I transmembrane proteins with a short intracellular domain and an extracellular part that includes a CTLD, a domain referred to as hydrophobic or sushi-like, one or more EGF domains, and low complexity Ser/Thr-rich regions, which are targets for O-glycosylation.
XV Bimlec	Type I transmembrane protein with neck region and CTLD in extracellular region.
XVI SEEC	Soluble protein containing SCP, EGF, EGF and CTLD domains (SEEC). The sperm-coating glycoprotein (SCP) domain, which is present in organisms from yeast and plants to mammals, but whose function is unknown, is rarely observed in combination with other domains in proteins. SCP/CTLD combination is observed in only one other known protein – Nowa from hydra.
XVII CBCP/Frem1/QBRICK	Large proteoglycan (2100 residues) containing a set of chondroitin sulphate proteoglycan (CSPG) repeats (homologous to the NG2 ectodomain), a calcium-binding Calx-b domain and a CTLD. CBCP (Calx-b and CTLD containing Protein)

Tableau 3. Classification des CTLRs.

Modifié d'après Zelensky and Gready (Zelensky and Gready 2005)

2. Fonction et classification

Les CTLRs myéloïdes constituent une famille des récepteurs cruciaux dans la reconnaissance d'une grande variété de ligands du soi ou du non soi, et donc dans la réponse immunitaire associée.

Ils sont très connus pour leur capacité à reconnaître des ligands provenant des pathogènes, les PAMPs. Mais de façon très intéressante, les CTLRs ont aussi la capacité

de reconnaître des ligands endogènes altérés provenant par exemples de cellules tumorales, et aussi des ligands associés au dommage cellulaire, les DAMPs.

Le réseau de signalisation est dépendent non seulement du récepteur, mais aussi de la nature, de la densité et de l'architecture du ligand. Les propriétés du ligand vont affecter la capacité d'internalisation du récepteur et le trafic intracellulaire, et par conséquent la signalisation induite par le récepteur (Iborra and Sancho 2015).

Les CTLRs sont exprimés majoritairement par les cellules de la lignée myéloïde telles que les monocytes, macrophages, granulocytes et cellules dendritiques. Cependant, certains d'entre-eux sont également exprimés par les cellules endothéliales. De façon dépendante de l'interaction récepteur-ligand et du type cellulaire impliqué, ces récepteurs vont induire différents types de réponses:

- Contrôle de l'activité microbicide (p. ex : l'activation de Mincle suite à la reconnaissance de *Malassezia pachidermatie* induit dans les macrophages l'expression de cytokines et chimiokines telles que le TNF- α , IL-6, CXCL2 et CXCL-1 impliquées dans la réponse immunitaire innée contre le pathogène (Yamasaki et al. 2009)).
- Régulation de l'homéostasie et de l'élimination des cellules apoptotiques (p. ex : DCIR 2 (Clec4a4) est un récepteur régulateur de l'activation des cDCs CD8 α - capable d'inhiber l'inflammation et la réponse immunitaire des cellules T. Kutsuaki Sato et son équipe ont montré le rôle de DCIR dans l'inhibition des réponses Th1 et Th17 dans un modèle d'encéphalomyélite chez la souris. Les souris Clec4a4^{-/-} montrent une progression de la maladie beaucoup plus importante que les souris WT. Ainsi, les cellules T spécifiques à l'antigène d'immunisation « oligodendrocyte glycoprotein peptide » (MOGp) provenant des souris Clec4a4^{-/-} montrent une plus forte prolifération et production des cytokines IL-17 et IFN- γ . Cette étude a mis en évidence que la déficience de DCIR exacerbe le développement de cette maladie autoimmune induite par les cellules T par une excessive activation des cDCs CD8 α - (Uto et al. 2016)).

- Polarisation de la réponse immune adaptative à partir de la sécrétion de cytokines et chimiokines (p. ex : Dectin-1 induit la polarisation des Th vers les Th17 suite à la reconnaissance des β -glucans présentés par *Candida albicans* par l'induction des cytokines comme IL-12p40, l'IL-23, IL-6 et IL-1 β (LeibundGut-Landmann et al. 2007a)).
- Adhésion cellulaire (p.ex : DC-SIGN reconnaît ICAM-2 et permet la migration trans-endothéliale des cellules (T. B. Geijtenbeek et al. 2000)).

Les CLR_s myéloïdes ont été classés dans trois catégories différentes selon leurs domaines intracytoplasmiques:

2.1 CLR_s couplés à « Spleen Tyrosine Kinase » (SYK)

Les CLR_s peuvent se coupler à Syk de deux manières différentes : d'une manière indirecte, par l'association avec des adaptateurs comme le « Fc receptor γ chain » (FcR γ) ou DAP-12 qui contiennent les domaines « Immunoreceptor Tyrosine-based Activatory Motif » (ITAM) capables de recruter Syk ; ou directe, par la présence d'un domaine intracytoplasmique hemiITAM (qui contient une seule tyrosine). La séquence du domaine ITAM est YxxI/Lx₍₆₋₁₂₎YxxI/L. La liaison du récepteur à son ligand permet le regroupement des récepteurs et la phosphorylation des tyrosines qui induisent l'adhésion de Syk par son domaine SH2 et par conséquent sa phosphorylation et son activation (Tsang et al. 2008).

Les voies de signalisation après l'activation de Syk constituent un grand réseau modulateur de la réponse immunitaire innée et adaptative (Plato, Willment, and Brown 2013b) et incluent:

- L'activation des MAPKs qui permettent la modification de la transcription de différents gènes, la réorganisation de l'actine qui constitue le cytosquelette cellulaire à travers l'activation des enzymes Rac et Rho GTPase, et l'activation

des facteurs de transcription, « Nuclear factor kappa B » (NF- κ B) et « Nuclear factor of activated T-cells » (NFAT) à partir de plusieurs voies différentes.

- L'activation de la kinase « Phosphatidyl inositol-3.4.5-triphosphate » (PI3K) qui active ensuite l'enzyme « Phospholipase $C\gamma 2$ » (PLC $\gamma 2$) ce qui génère le « Inositol triphosphate » (IP $_3$) et le « diacylglycerol » (DAG). Ces molécules sont importantes pour la mobilisation du Ca $^{2+}$ vers le cytosol et pour l'activation des protéines kinases C (PKC). La PKC va activer le NF- κ B via le complexe Card 9 important dans l'induction d'expression de certaines cytokines et chimiokines impliquées la réponse immunitaire.

Dans ce sous-groupe sont inclus les CLR avec un domaine HemITAM (Dectin-1, CLEC-2, DNGR-1 et SIGN-R3) et les CLR couplés à d'autres molécules avec des domaines ITAM (Dectin-2, hBDCA-2, mDCAR, mDCAR1, Mincle et MDL-1).

- DECTIN-1

« Dendritic-cell-associated C-type lectin 1 » (Dectin-1) est un CLR exprimé par les cellules dendritiques, monocytes, macrophages, neutrophiles et lymphocytes T $\gamma\delta$ chez la souris (Taylor et al. 2002; Martin et al. 2009). Chez l'homme, Dectin-1 a un profil d'expression similaire, mais est également exprimé par les lymphocytes B, éosinophiles et mastocytes (Willment et al. 2005; Olynch, Jakeman, and Marshall 2006). Dectin-1, par son CTLD, reconnaît de façon indépendante du Ca $^{2+}$, des ligands β -glucanes présents sur les membranes cellulaires des bactéries et champignons, et aussi des ligands du soi exprimés par les lymphocytes T non identifiés (Palma et al. 2006; Ariizumi et al. 2000) ou par d'autres types de cellules comme par exemple la protéine Galectin 9 exprimée par l'adénocarcinome du pancréas (Daley et al. 2017).

Plusieurs études ont été réalisées dans le but d'illustrer les possibles voies de signalisation liées à leurs domaines cytoplasmiques (Figure 10). Le réseau d'activation est dépendant du ligand et induit la maturation et l'expression des cytokines et chimiokines spécifiques des réponses immunitaires innée et adaptative dans les DCs.

Le CTLD est connecté par une région tige au domaine transmembranaire, lui-même connecté à la région cytoplasmique composé de deux motifs différents, le motif tri-acide (DED) suivi du motif hemITAM (YxxL/I).

Une première voie classique d'activation du NFκB a été montrée. La protéine kinase Syk est recrutée par deux récepteurs phosphorylés au niveau de la seule tyrosine présente dans le motif hemITAM. L'activation de Syk recrute le complexe CARD9/Bcl10/Malt-1 au niveau de la membrane, ou au niveau des phagosomes qui contiennent des particules des pathogènes ce qui induit l'activation du complexe IκB Kinase (IKK) (composé de trois sous-unités, l'IKKα, l'IKKβ et l'IKKγ) (Rosas et al. 2008; Hernanz-Falcón et al. 2009; Goodridge et al. 2009). Le complexe IKK phosphoryle ensuite l'inhibiteur du facteur de transcription NFκB (IκBα) et induit sa dégradation par le protéasome. La dégradation de l'inhibiteur du NFκB permet sa libération et son entrée ultérieure dans le noyau (Gross et al. 2006). Les protéines CARD9 et Bcl10 sont impliquées dans l'activation du NFκB sous forme de dimère p65 (RelA)/p50, alors que Malt-1 est impliquée dans l'activation du NFκB sous forme de dimère c-Rel/p50 (Gringhuis et al. 2011).

Une deuxième voie non classique d'activation du NFκB a également été montrée. Dans cette voie, l'activation de Syk implique le « NFκBI inducing Kinase » (NIK) et le complexe IKKα qui permettent la protéolyse de p-100 à p-52, et ainsi la translocation au niveau du noyau du NFκB sous forme de dimère Rel-B/p52 (Gringhuis, den Dunnen, Litjens, van der Vlist, Wevers, et al. 2009a).

La forme dimère du facteur de transcription NFκB détermine l'affinité aux différents promoteurs et donc l'expression ou la répression des différents gènes impliqués dans la réponse immunitaire. Les dimères classiques p65/p50 et c-Rel/p50 induisent l'expression des cytokines polarisantes Th1 et Th17, l'IL-12p35, l'IL-6 et l'IL-23p19. Cependant, le dimère non classique Rel-B/p52 réprime l'expression d'IL-12p40 et l'IL-1β aussi importants dans cette même polarisation.

La répression des gènes par le dimère Rel-B/p52 est régulée par Dectin-1 à travers d'une autre voie de signalisation liée à la protéine Kinase Raf-1. Cette voie d'activation qui est indépendante de la protéine Kinase Syk, intervient au niveau du facteur de transcription NF-κB activé par d'autres voies dépendantes de Syk. Raf-1

induit une phosphorylation sélective (Serine 276) qui permet successivement l'acétylation de la sous-unité p65 du NF- κ B (Gringhuis et al. 2007a; Gringhuis, den Dunnen, Litjens, van der Vlist, Wevers, et al. 2009). L'acétylation du p65 permet d'enlever la sous-unité RelB du dimère répresseur RelB/p52, et la formation d'un dimère inactif RelB/p65, incapable de s'hybrider à l'ADN, et permet donc d'enlever la répression des gènes IL-12p40 et d'IL-1 β importantes dans la polarisation des Th17 (Gringhuis, den Dunnen, Litjens, van der Vlist, Wevers, et al. 2009a).

Plusieurs études ont montré la capacité de Dectin-1 à induire des voies de signalisation immunomodulatrices de la réponse inflammatoire, notamment la réponse Th17. La régulation d'IL-1 β est donc un mécanisme important dans le contrôle de la réponse Th17. L'expression d'IL-1 β n'est pas seulement contrôlée par les divers dimères du NF κ B, mais aussi par la signalisation liée au récepteur de l'IFN- β , l'IFNAR. La reconnaissance des β -glucans présentés par *Candida albicans* induit l'activation de « Syk-dependent interferon-regulatory factor 5 » (IRF5) responsable de l'expression d'IFN- β . La reconnaissance d'IFN- β par IFNAR induit la régulation négative d'IL-1 β et favorise l'expression d'IL-27 impliquée dans l'inhibition des Th17 (del Fresno et al. 2013).

Un autre mécanisme de régulation d'IL-1 β a été décrit dans la littérature. L'activation de Dectin-1 par les β -Glucans présentés par les pathogènes fongiques, induit l'activation de la Caspase 1 ou Caspase 8. Cette activation est dépendante ou non de l'internalisation du pathogène respectivement. Ces Caspases, qui font partie de l'inflamasome NLRP3, prennent en charge le clivage de la pro-IL-1 β vers sa forme active IL-1 β (Gringhuis et al. 2012; Ganesan et al. 2014).

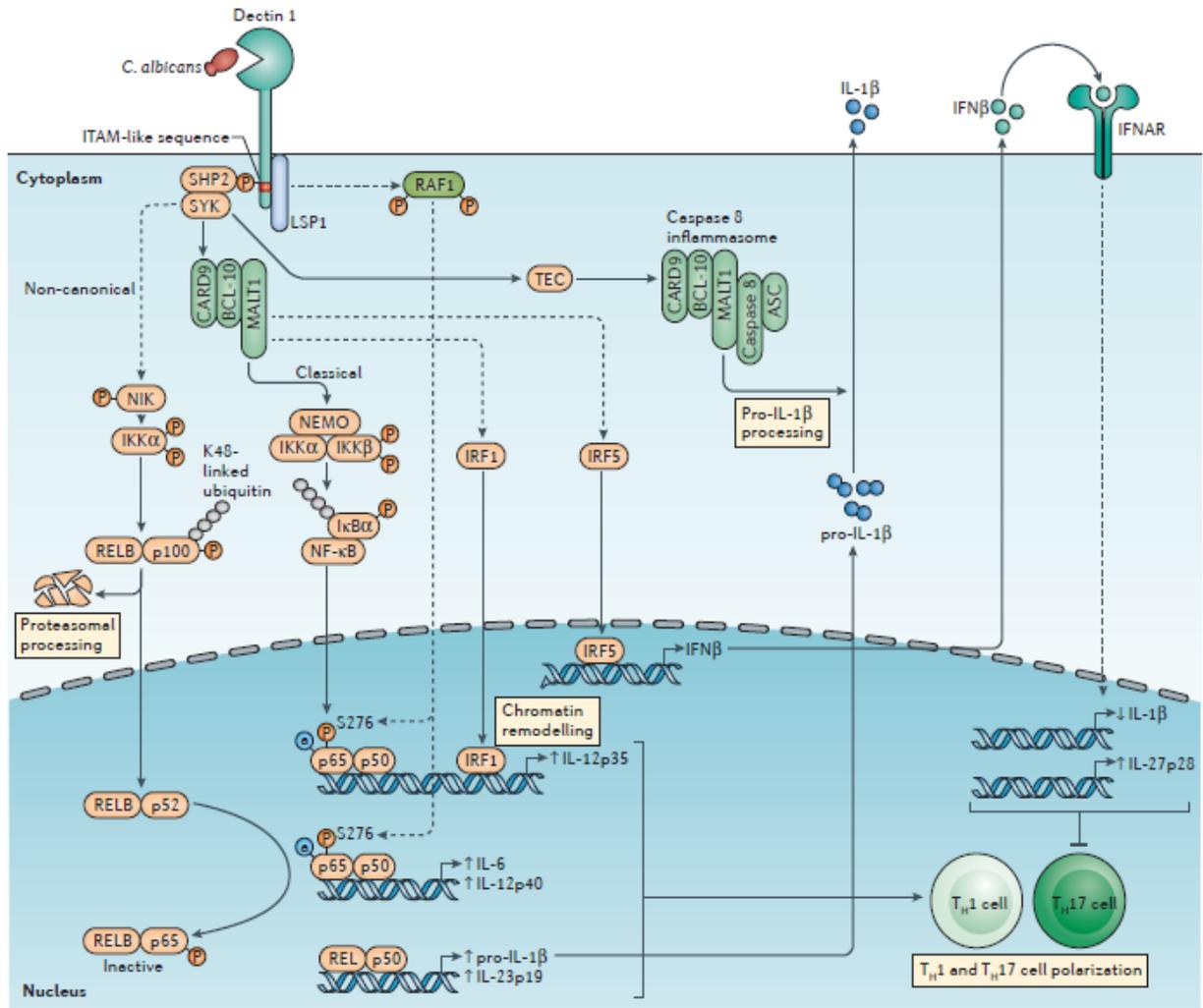


Figure 10. Signalisation de Dectin-1 dans la réponse Th.

D'après Geijtenbeek and Gringhuis (Geijtenbeek and Gringhuis 2016).

Dectin-1 est un récepteur capable d'intégrer plusieurs voies de signalisation dépendantes ou non de Syk. Cette intégration confère aux DCs les compétences nécessaires pour l'activation et polarisation des lymphocytes Th $CD4^+$, et aussi pour l'activation des lymphocytes cytotoxiques T $CD8^+$. Il a été montré *in vitro* la capacité de Dectin-1 à induire la maturation des DCs après stimulation avec le ligand curdlan. Cette activation favorise la polarisation des Th vers les Th17 par l'induction d'IL-23, IL-6. En outre, l'infection des souris avec *Candida albicans* induit une réponse Th17 (LeibundGut-Landmann et al. 2007a). Il a également été montré *in vivo* que l'infection des souris avec *Aspergillus fumigatus* inhibe la réponse Th1 ce que favorise la polarisation de la réponse Th vers les Th17 (Rivera et al. 2011a).

Dectin-1 est un récepteur aussi important dans la réponse T CD8⁺ cytotoxique. Une étude a montré que les DCs stimulées avec le ligand curdlan induisent l'expansion *in vitro* des cellules T cytotoxiques. Cette induction est dépendante de l'IL-12p70 produite par les DCs activées en réponse à l'IFN- γ produit par les cellules T CD8⁺ cytotoxiques. En outre, les souris immunisées avec le curdlan et les cellules tumorales (mélanome B16 exprimant de la protéine OVA) étaient protégées contre le développement de la tumeur (Leibundgut-Landmann et al. 2008a).

La capacité de la signalisation de Dectin-1 à activer NF- κ B est aussi dépendante du type de cellules myéloïdes. Les cellules dendritiques (DCs) dérivées des progéniteurs provenant de la moelle osseuse cultivés *in vitro* en présence de GM-CSF sont activées par les agonistes β -glucanes du Dectin-1. En revanche, celles qui ont été cultivées en présence de Flt3L et les macrophages cultivés en présence de GM-CSF ne sont pas stimulés par les agonistes du Dectin-1. Ces différences peuvent être attribuées à l'expression de CARD9 et/ou aux autres molécules impliquées dans les voies de signalisation. Cependant, le prétraitement des macrophages avec GM-CSF et IFN- γ favorise la réponse induite par Dectin-1 sans modifier l'expression de CARD-9, ce qui suggère l'implication d'autres facteurs activateurs et inhibiteurs combinés dans l'activation du récepteur (Goodridge et al. 2009).

- MINCLE

Le « Macrophage-inducible C-type lectin » (Mincle) est faiblement exprimé par les macrophages, neutrophiles et cellules dendritiques, mais il est augmenté suite à une activation par des cytokines pro-inflammatoires et des ligands des TLRs (Yamasaki et al. 2008).

Par des analyses d'alignement et de comparaisons de séquences provenant de l'homme, de la souris et du rat, la présence d'un résidu d'arginine très conservé dans le domaine transmembranaire de Mincle a été mis en évidence. Ce résidu est responsable de l'association de Mincle avec la chaîne transmembranaire du FcR γ , et donc de la formation d'un complexe stable et fonctionnel au niveau de la surface cellulaire (Yamasaki et al. 2008). Mincle peut être aussi partiellement dépendant d'un

autre CLR, le « Macrophage-restricted C-type lectin » (MCL), qui contrôle l'expression de Mincle à la surface cellulaire par la formation d'hétérocomplexes stables. Cependant, l'activation de Mincle reste indépendante du MCL (Lobato-Pascual et al. 2013; Wevers et al. 2014).

Mincle contient un domaine très conservé de reconnaissance aux carbohydrates dépendant du Ca^{2+} . Par son motif EPN (Glu-Pro-Asn), il reconnaît des ligands α -mannose provenant d'espèces fongiques comme *Malassezia*, *Candida albicans* ou *Fonsecaea Petrosi*. Mincle a donc un rôle très important dans la défense contre ces pathogènes à l'aide du domaine ITAM présent dans la chaîne FcR γ . L'activation de Mincle suite à la reconnaissance de *Malassezia pachidermatie* induit une sur-expression de Mincle dans les macrophages, mais aussi l'expression de cytokines et chimiokines comme TNF- α , IL-6, CXCL2 et CXCL-1 impliquées dans la réponse immunitaire innée contre le pathogène (Bugarcic et al. 2008; Yamasaki et al. 2008; Wells et al. 2008).

Egalement, il a été montré dans la littérature le rôle de Mincle dans l'activation des cellules présentatrices d'antigènes, notamment les DCs, et par conséquent dans le priming et la polarisation de la réponse immunitaire T. Mincle reconnaît un composant de la paroi cellulaire de *Mycobacterium tuberculosis*, le glycolipide Threhalose-6,6'-dymicolate (TDM) (appelé aussi « mycobacterial cord factor ») (Ishikawa et al. 2009). La reconnaissance de TDM et son analogue, Threhalose-6,6'-dibehenate (TDB), par Mincle est capable d'induire l'activation du NF κ B dans les macrophages et cellules dendritiques. Cette activation se fait via la chaîne FcR γ et plus particulièrement Syk et le complexe Card9. Elle est responsable de la surexpression du CMH-II et des molécules de costimulation CD40, CD80 et CD86 dans les cellules dendritiques et de l'augmentation de la production d'oxygène nitrique. Elle entraîne aussi la production de cytokines pro-inflammatoires comme IL-1 β , IL-6, IL-12p40, IL-12p70, IL-23p19 qui polarisent la réponse Th vers les Th1 et Th17 (Ishikawa et al. 2009; Werninghaus et al. 2009; Schoenen et al. 2010). L'activation de Mincle par le TDB favorise également la réponse Th17 par une autre voie de signalisation qui permet la production d'IL-1 β , responsable de la polarisation des cellules Th vers les Th17. En effet la fixation du ligand sur Mincle induit l'activation du complexe inflammasome Nlrp3, qui permet

l'hydrolyse par la Caspase 1 de la pro-IL-1 β en IL-1 β (Schweneker et al. 2013) (Figure 11).

De façon intéressante, il a été montré que l'interaction de la voie de signalisation de Mincle au niveau de la signalisation liée aux autres récepteurs comme Dectin-1, peut réorienter la polarisation des cellules Th. Mincle inhibe la réponse Th1 induite par le récepteur Dectin-1 et favorise la réponse Th2 par la suppression de l'expression de la sous-unité fonctionnelle de l'IL-12, l'IL-12p35, suite à la reconnaissance de *Fonseca monophora* (Wevers et al. 2014). Mincle induit l'activation de la « phosphoinositide 3-Kinase » (PI3K) via FcR γ par la phosphorylation de Syk qui active le complexe Card9. La PI3K phosphoryle et active la « protein Kinase B » (AKT) qui permet l'activation et translocation au noyau de l'ubiquitine ligase E3, Mdm2. Le Mdm2 cible le facteur régulateur de l'INF, l'IRF1, impliqué dans la transcription du gène codant pour l'IL-12p35, et induit donc sa dégradation par le protéasome (Wevers et al. 2014). Par ailleurs, la reconnaissance d'une autre espèce, *Fonseca pedrosi*, est impliquée cette fois-ci, dans l'inhibition de la réponse Th17 induite par Dectin-2 via Syk qui active le complexe Card9, mais les mécanismes restent inconnus (Wüthrich et al. 2015) (Figure 11).

II. C-type lectin receptors

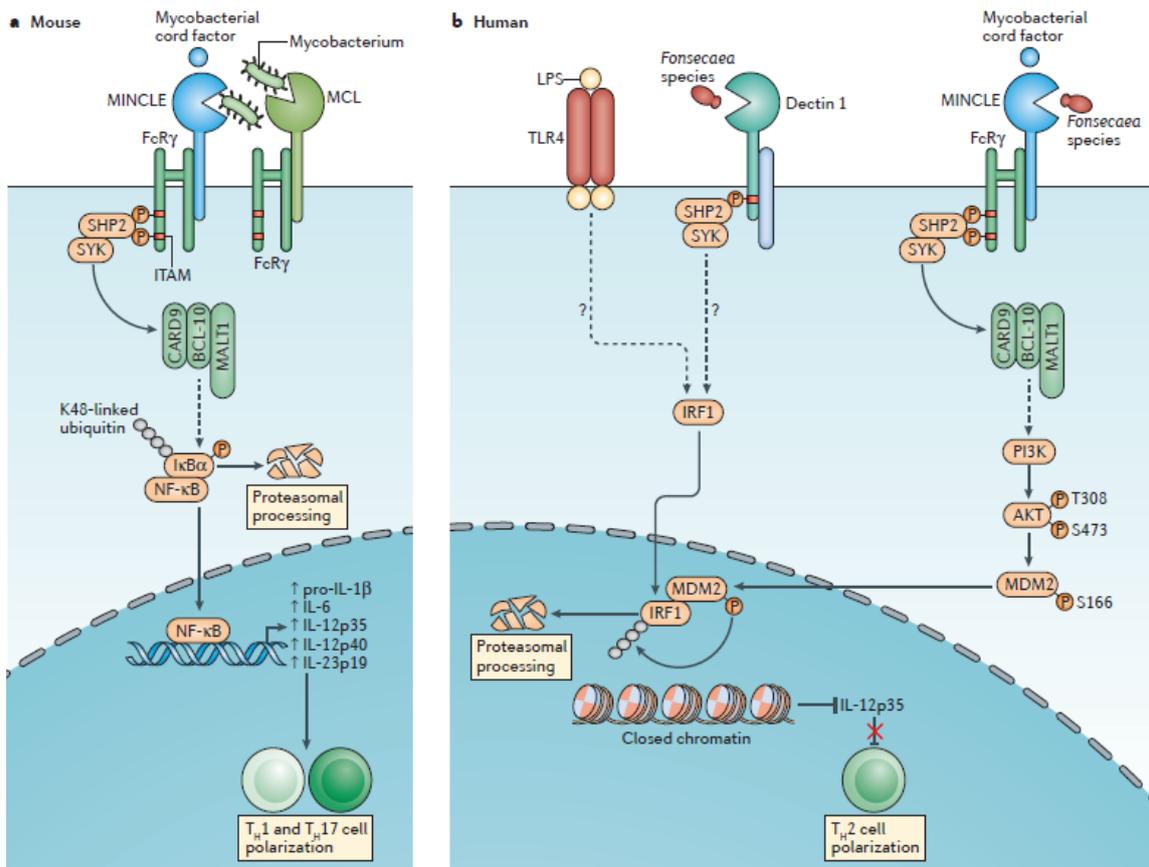


Figure 11. Signalisation de Mincle dans la réponse Th.

D'après Geijtenbeek and Gringhuis (Geijtenbeek and Gringhuis 2016).

Mincle est aussi un important récepteur de mort cellulaire, il reconnaît le ligand endogène SAP-130, une ribonucléoprotéine présente dans les corps apoptotiques. La reconnaissance de SAP-130 est indépendante de la présence de Ca^{2+} , ce qui suggère la présence d'un autre CDR non classique. La reconnaissance de SAP-130 par Mincle dans les macrophages induit la production de cytokines et chimiokines comme le $\text{TNF-}\alpha$ et le CXCL2 via le complexe FcR γ – SyK – Card9, ce qui conduit à l'infiltration de neutrophiles et à la réponse inflammatoire (Yamasaki et al. 2008) (Figure 11).

2.2 CLR avec des domaines « Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif » (ITIM)

Les CLR contenant des motifs ITIM sont souvent impliqués dans la régulation négative des voies activées via les domaines ITAM. Les motifs ITIM, I/V/L/SxYxxI/L/V, recrutent des phosphatases via la phosphorylation de la tyrosine par des kinases de la famille Src. Ces phosphatases vont donc réguler négativement l'activité des voies de signalisation. Dans de nombreux cas, les CLR contenant des domaines ITIM sont associés aux protéines tyrosine phosphatase contenant un domaine SH2, les SHP-1 et SHP-2. Ces protéines sont capables d'affecter directement les capacités de signalisation de JAK/STAT, impliqués dans l'expansion cellulaire, et la signalisation dépendante des motifs ITAM. SHP-1 et SHP-2 peuvent réguler également les voies d'activation du NF- κ B dépendantes des TLR. L'hypothèse actuelle sur les mécanismes en jeu est que le signal ITIM pourrait réduire la collaboration synergique entre les TLRs et les CLR (Plato, Willment, and Brown 2013). De plus, les protéines SHP-1 et SHP-2 par association avec des inositol phosphatases contenant un domaine SH2, vont inhiber la signalisation dépendante de PI3K (M. Sattler et al. 2001). Les CLR vont donc moduler l'activation déclenchée par les récepteurs activateurs dans les cellules myéloïdes.

Les CLR myéloïdes inclus dans ce sous-groupe sont hDCIR, mDcir1, mDcir2, MICL, MØ antigène H et Ly49Q.

- DCIR

Le « dendritic cell immunoreceptor » (DCIR) est une glycoprotéine transmembranaire de type II de 276 aa. Il contient un domaine extracellulaire classique de reconnaissance aux carbohydrates et un domaine cytoplasmique contenant un motif ITIM. DCIR reconnaît des ligands glycanes composés de mannose et/ou fucose (R. T. Lee et al. 2011).

Il est exprimé par les monocytes, macrophages, lymphocytes B, granulocytes, et cellules dendritiques. L'expression de DCIR dans les cellules dendritiques est diminuée après stimulation par le ligand de CD40, le LPS et le TNF- α , ce qui suggère que son expression est dépendante de l'état de maturation et d'activation des cellules dendritiques (Bates et al. 1999).

Plusieurs fonctions ont été attribuées de manière directe à DCIR. Jusqu'à présent, les ligands reconnus par DCIR n'ont pas été caractérisés, mais ils pourraient agir comme des récepteurs importants dans la captation et la propagation du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Lambert et al. 2008). La reconnaissance du VIH par le récepteur DCIR dans une lignée de cellules B qui co-expriment le CD4 déclenche des voies de signalisation qui vont impliquer, via la phosphorylation du domaine ITIM, l'activation des phosphatases SHP-1, SHP-2, mais aussi des kinases Syk et Src (Src, Fyn et Hck). Ces enzymes vont aider à l'internalisation du VIH par l'activation de la voie PKC- α , et les MAP Kinases (p38, and Erk1/2), (Lambert et al. 2011).

DCIR est un médiateur également important dans la cross-présentation d'antigènes pour différents sous-types de cellules dendritiques comme les cellules de Langerhans, et les DCs myéloïdes et plasmacytoïdes du sang. Il a été montré qu'en réponse aux antigènes du soi comme le MART-1, et du non soi comme l'HIV gag, DCIR induit une augmentation de la réponse T CD8 cytotoxique (Klechevsky et al. 2010). En outre, chez la souris, DCIR 2 est reconnu par l'anticorps 33D1, un anticorps spécifique de la sous-population de cellules dendritiques CD8⁻ impliquées dans la cross-présentation d'antigènes (Dudziak et al. 2007b).

DCIR a été décrit dans la littérature comme un récepteur polyvalent caractérisé de façon très importante par sa capacité à inhiber les voies de signalisation liées aux TLRs ou aux domaines ITAM, et par conséquent à inhiber les réponses immunitaires dépendantes de ces récepteurs (Figure 12).

Plusieurs études ont montré la capacité de DCIR à inhiber les voies d'activation induites par les TLRs. L'activation de DCIR par « crosslinking » avec des anticorps induit une rapide endocytose dans les moDCs et pDCs. Cette internalisation est dépendante de la clathrine et permet la localisation de DCIR dans les endosomes et lysosomes où sont localisés les TLRs 8 et 9. L'activation de DCIR inhibe la production d'IL-12 et de

TNF- α induite par l'activation du TLR-8 dans les moDCs et la production d'IFN- α induite par l'activation du TLR-9 dans les pDCs (Meyer-Wentrup et al. 2009a, 2008). L'activation du TLR-9 induit en plus une augmentation de l'expression de DCIR par les macrophages. L'inhibition de l'expression de DCIR par des siRNA a induit une augmentation de l'activation de Erk1/2, JNK1/2 et p38 suite à une stimulation avec du TLR-9, et par conséquent, une augmentation de la production d'IL-6 et d'IL-1 β (Zhao et al. 2015). Ces preuves démontrent la capacité de DCIR à inhiber la réponse immunitaire innée induite par les TLRs.

Plusieurs études montrent également le rôle inhibiteur de DCIR dans la réponse immunitaire adaptative par inhibition de la signalisation liée aux domaines ITAM. Kanazawa et al. ont montré *in vitro* que DCIR 1 inhibe la signalisation du récepteur des lymphocytes B (BCR) en condition de co-expression avec un récepteur chimère (DCIR-FcR) composé par le domaine extracellulaire Fc γ R-IIB spécifique de FLAG et le domaine intracellulaire DCIR 1 (Kanazawa et al. 2002). En outre, la déficience en DCIR 1 dans les BMDCs favorise l'activation de STAT5 en réponse au GM-CSF, ce qui suggère un rôle de DCIR dans l'homéostasie de la réponse immunitaire, à travers l'inhibition de l'expansion des cellules (Fujikado et al. 2008). *In vivo*, plusieurs études ont montré que la déficience en DCIR 1 chez la souris favorise l'induction de maladies auto-immunes comme l'encéphalomyélite, le sialadénite, l'enthésite et l'arthrite induite au collagène (Seno et al. 2015). En outre, DCIR 2 (Clec4a4) est un récepteur régulateur de l'activation des cDC CD8 α^{-} capable d'inhiber l'inflammation et la réponse immunitaire des cellules T. Le rôle de DCIR 2 (Clec4a4) dans l'inhibition de la réponse Th1 et Th17 a été montré dans un modèle d'encéphalomyélite chez la souris. Les souris Clec4a4 $^{-/-}$ montrent une progression de la maladie beaucoup plus importante que les souris WT. Ainsi, les cellules T spécifiques à l'antigène d'immunisation « oligodendrocyte glycoprotein peptide » (MOGp) provenant des souris Clec4a4 $^{-/-}$ montrent une plus forte prolifération et production des cytokines IL-17 et IFN- γ . Cette étude a mis en évidence que la déficience de DCIR exacerbe le développement de cette maladie auto-immunitaire induite par les cellules T par une activation excessive des cDCs CD8 α^{-} (Uto et al. 2016). Par ailleurs, Olivier Neyrolles et son équipe ont montré également le rôle inhibiteur de DCIR 2 dans la réponse Th1 dans un modèle infectieux avec *M.*

tuberculosis chez la souris. La déficience de DCIR empêche la signalisation de la voie de l'IFN de type I induite par STAT-1 (connue pour inhiber la production d'IL-12p70 dans les cellules myéloïdes) au niveau des DCs ce qui permet l'augmentation de la production d'IL-12 et de la différenciation des lymphocytes T vers les Th1, et donc un meilleur contrôle de l'infection par *Mycobacterium tuberculosis* (Troegeler et al. 2017).

DCIR est donc un récepteur important dans la modulation de l'activation des cellules présentatrices d'antigènes notamment les DCs, et par conséquent, dans le priming et la polarisation de la réponse immunitaire T.

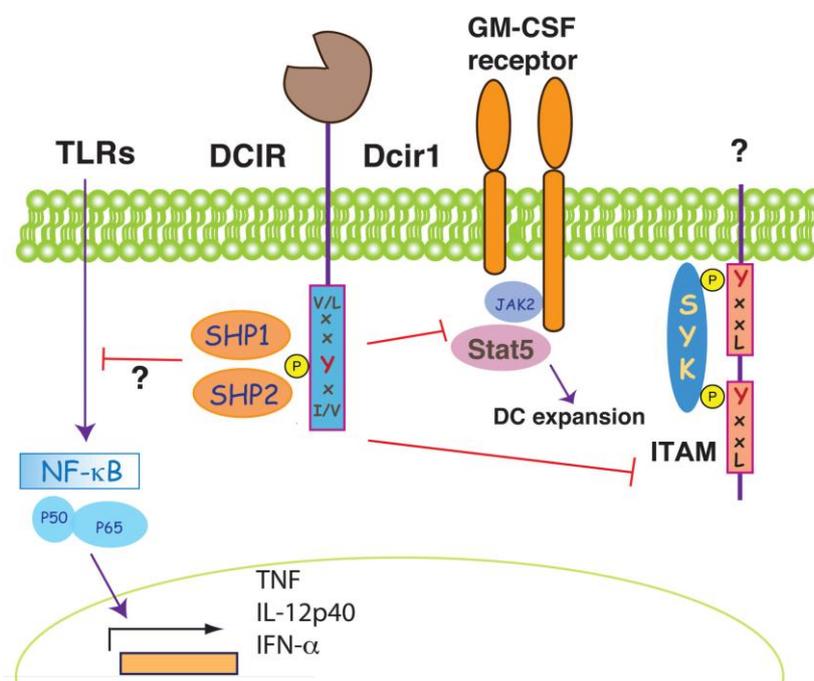


Figure 12. Inhibition de la signalisation des TLRs et des récepteurs ITAM par DCIR.

D'après Sancho and Reis e Sousa (Sancho and Reis e Sousa 2012).

2.3 CLR sans les domaines ITAM ni ITIM

Ce sous-groupe englobe les CLR sans motif ITAM ou ITIM clair, y compris le récepteur de mannose, DEC-205, DC-SIGN, SIGNR1, Langerin, hMGL, mMgl1, mMgl2, CLEC-1, DCAL-1, MCL, LOX-1 Et LSECtin. Ces CLR ont une activité d'endocytose et

peuvent servir de médiateur pour la capture d'antigènes pour le traitement et la présentation aux cellules T. Pour certains CLR (par exemple, DC-SIGN), la voie de signalisation impliquée dans la modulation a été élucidée mais, pour la plupart, elle est inconnue.

- DC-SIGN

La molécule « DC-spécifique ICAM-grabbing non intégrin » (DC-SIGN or CD209) est exprimée principalement par les cellules dendritiques myéloïdes, mais aussi par les macrophages et les cellules endothéliales du foie. Le CDR a un motif très conservé, le EPN (Glu-Pro-Asn), ce qui permet sa liaison avec des glycanes à base de mannose, mais aussi à base de fucose comme les antigènes Lewis (Le) : Le^X, Le^Y, Le^A, Le^B. Ces ligands sont présents dans la membrane cellulaire chez différents pathogènes comme « human immunodeficiency virus » (*HIV-1*), « Cytomegalovirus » (*CMV*), *Mycobacterium tuberculosis*, *E. Coli*, *Helicobacter pilory*, *Candida Albicans*, dans des allergènes et aussi dans des ligands du soi (Lai et al. 2006).

DC-SIGN reconnaît certaines molécules du soi comme les glycoprotéines ICAM-2 et 3 qui participent à l'adhésion intercellulaire, ce qui lui confère un rôle important dans la migration trans-endothéliale des DCs et dans l'interaction entre les cellules dendritiques et les cellules T (T. B. Geijtenbeek, Torensma, et al. 2000).

Son domaine intracytoplasmique comprend trois motifs différents: un premier avec la présence de Tyrosine, un deuxième composé par deux Leucines, et un troisième motif tri-acide. Une étude a montré que ces motifs sont impliqués dans l'internalisation rapide du récepteur suite à la reconnaissance d'un ligand soluble, et que les complexes récepteur-ligand sont localisés dans les endosomes et lysosomes tardifs suite à cette internalisation (Engering et al. 2002). DC-SIGN a été également localisé dans les phagosomes ; de plus, la transfection du DC-SIGN dans les cellules HeLa non phagocytaires, permet ensuite l'adhésion et la phagocytose d'*Escheritia Coli* (Geijtenbeek et al. 2003), (Zhang et al. 2006). DC-SIGN permet donc la reconnaissance et l'internalisation d'agents pathogènes grâce à un ligand spécifique qui peut être

soluble ou composant d'un microorganisme ce qui permet une dégradation efficace de ces agents et des présentations successives d'antigènes aux cellules T.

Plusieurs études ont été faites dans le but de comprendre les mécanismes de signalisation liés à l'activation de DC-SIGN (Figure 13 et 14).

Une étude a montré que la signalisation après l'activation du DC-SIGN, par le VIH-1 ou par des anticorps spécifiques du domaine extracellulaire, nécessite la présence de Tyrosine dans son domaine intracytoplasmique. Cette signalisation implique LARG, un « guanine nucleotide-exchange factor » (GEF), qui induit l'activation de la protéine Rho-GTPase. Le complexe LARG-Rho-DC-SIGN est donc essentiel dans la pathogenèse du HIV-1 (Hodges et al. 2007a). Plus tard, il a été montré que les effecteurs LARG et Rho sont recrutés par DC-SIGN à travers un complexe appelé « signalosome » composé des protéines « Lymphocytes-specific protein 1 » (LSP1), « kinase-suppressor of Ras1 » (KSR1) et « connector enhancer of KSR » (CNK). L'ensemble de ces protéines est essentiel pour l'activation de la voie d'activation dépendante de Raf-1 (Gringhuis, den Dunnen, Litjens, van der Vlist, and Geijtenbeek 2009).

La voie de signalisation Raf-1 est impliquée dans la modulation de la voie de signalisation de certains TLRs au niveau du facteur de transcription NF- κ B. Et de façon très importante cette modulation est liée à la nature du ligand.

L'induction de DC-SIGN par ManLAM (glycolipide à base de mannose provenant de *Mycobacterium*) dans les DCs humaines induit la phosphorylation de la serine et thréonine de la protéine Kinase Raf-1. L'activation de Raf-1 permet ensuite la phosphorylation puis l'acétylation de la serine 276 de la sous-unité p65 du NF- κ B activée par l'induction des TLRs 3, 4 et 5. L'acétylation de p65 prolonge et augmente l'expression des cytokines polarisantes de la réponse Th1 et Th17 comme l'IL-12 et l'IL-6, et des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 (Gringhuis et al. 2007b; Gringhuis, den Dunnen, Litjens, van der Vlist, and Geijtenbeek 2009).

Cependant, contrairement à l'activation de la voie Raf-1 par l'interaction DC-SIGN avec ManLAM, la signalisation induite par Salp 15 (protéine produite par les glandes salivaires dans la tique (*Ixodes scapularis*) conduit à l'activation de « Mitogen-activated protein kinase Kinase » (MEK) par Raf-1. L'activation de MEK favorise la

dégradation des ARNm de l'IL-6 et du TNF- α et la diminution de la sécrétion d'IL-12 induite par les TLR 2 et 4 ce qui induit un état d'immunosuppression responsable de la transmission des pathogènes comme *Borrelia burgdoferi* de la tique à l'homme (Hovius et al. 2008).

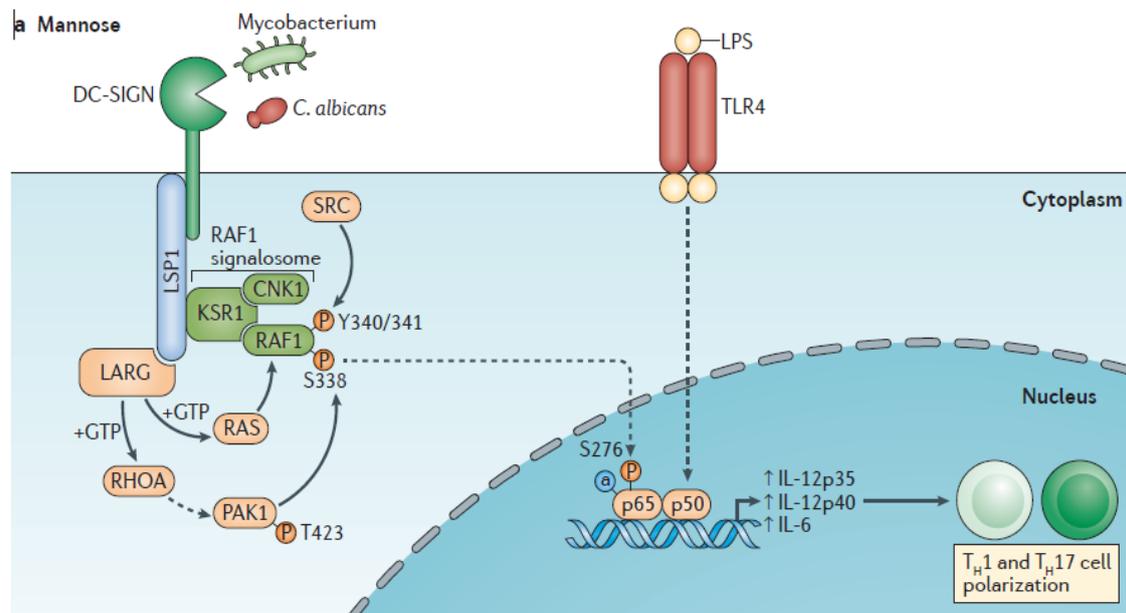


Figure 13. Signalisation de DC-SIGN dans la réponse Th.

D'après Geijtenbeek and Gringhuis (Geijtenbeek and Gringhuis 2016).

La stimulation de DC-SIGN par des ligands à base de fucose peut entraîner la modulation de la voie de signalisation de TLRs de façon indépendante de l'activation de Raf. Les antigènes Lewis présents sur des ligands provenant par exemple d'*Helicobacter pilory* sont responsables de la dissociation du « signalosome ». DC-SIGN reste donc associé uniquement à LSP1, qui recrute la kinase « serine/threonine I κ B kinase subunit- ϵ » (IKK ϵ) et à la « Lysine 63 deubiquitinase » (CYLD). Ce nouveau complexe active BCL-3 qui favorise l'activation induite par les TLRs du NF κ B sous forme de dimère p50-p50. Ce dimère, contrairement à p65-p50, induit dans les DCs la répression de l'expression d'IL-12, IL-23 et IL-6 et favorise l'expression d'IL-10 et des chimiokines associées aux cellules Th2, les CCL17 et CCL22. Cette signalisation bloque

donc la réponse Th1 et Th17 et favorise la réponse Th2 (Gringhuis, den Dunnen, Litjens, van der Vlist, and Geijtenbeek 2009; Gringhuis et al. 2014).

En outre, il a été démontré que DC-SIGN est important dans l'immunorégulation de la réponse immunitaire à travers l'induction de la production d'IL-10 associée à l'induction des cellules T régulatrices et à la survie prolongée de l'allogreffe. Jordi Ochoa et son équipe ont mis en évidence la sur-expression du DC-SIGN par une sous-population de macrophages suppresseurs $CD11b^+CSF1R^+Ly6C^{lo}CD169^+$ qui ont été associés à l'induction de la tolérance à l'allogreffe cardiaque par le traitement avec des anticorps anti-CD40L chez la souris. Au niveau mécanistique, ils ont montré que la reconnaissance des ligands fucosylés par DC-SIGN, en parallèle à l'activation du TLR-4, est associée à la production de la cytokine IL-10 impliquée dans le développement des lymphocytes T régulateurs et dans l'inhibition des cellules T $CD8^+$, ce qui permet une survie prolongée de l'allogreffe (Conde et al. 2015).

Les ligands fucosylés induisent également l'expression d'IL-27 impliquée dans la différenciation des cellules Th folliculaires. Cette induction est dépendante de l'activation du récepteur « interferon- α/β receptor » (IFNAR). Après activation par la reconnaissance d'IFN- β induit par les TLRs, IFNAR permet la formation du complexe transcriptionnel « IFN-stimulated gene factor 3 » (ISGF3) qui régule positivement l'expression d'IL-27 et donc la différenciation des Tfh (Gringhuis et al. 2014).

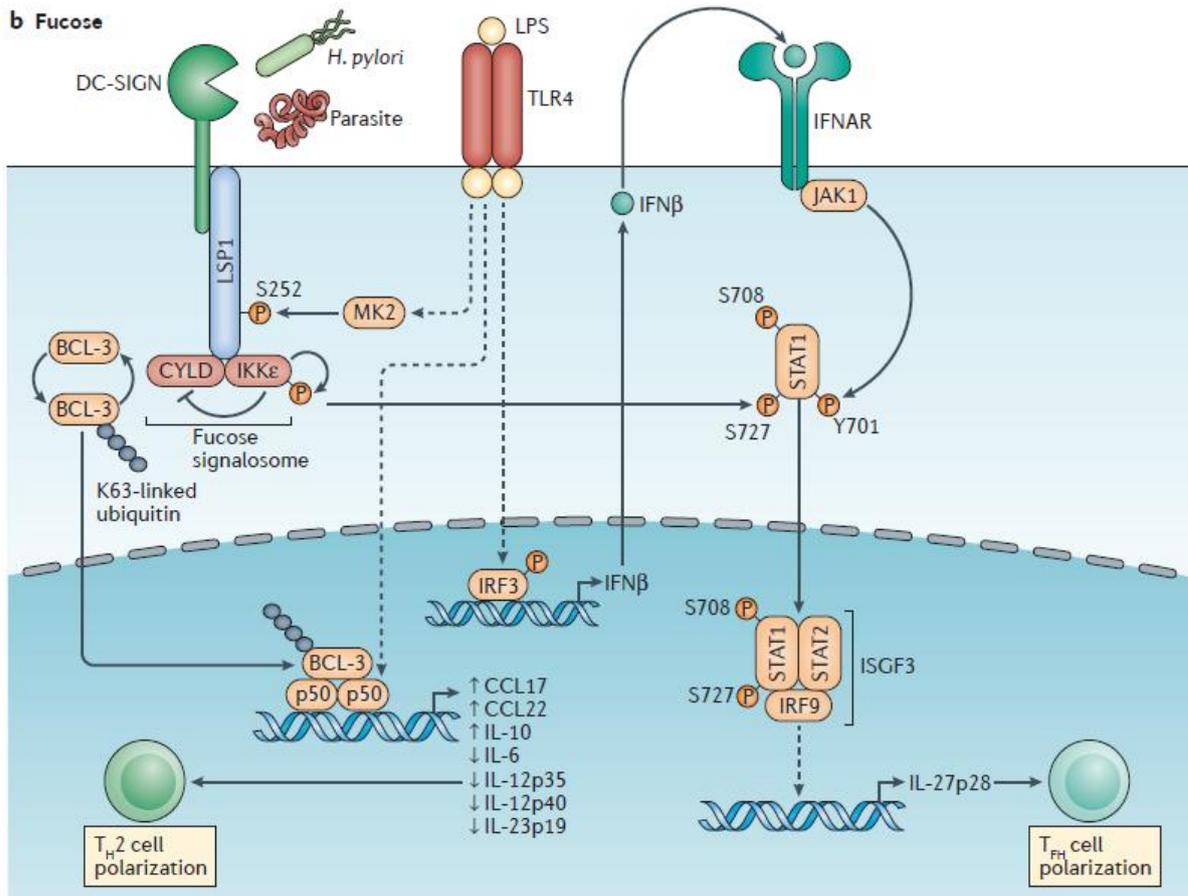


Figure 14. Signalisation de DC-SIGN dans la réponse Th.

D'après Geijtenbeek and Gringhuis (Geijtenbeek and Gringhuis 2016).

Ainsi, la signalisation par DC-SIGN, que ce soit pour l'endocytose ou la modulation de l'expression des gènes, est très fortement dépendante de la nature du ligand et du sous-type cellulaire. Elle peut conduire la réponse immunitaire vers la polarisation des cellules Th ou vers la tolérance avec la production de cellules T régulatrices.

3. Le potentiel thérapeutique des CLRs

Il existe une énorme diversité dans la réponse immunitaire induite par les CLRs qui dépend du type de CLR et du sous-type de DC impliqués, et également de la nature du ligand et de leur co-liaison à d'autres PRRs. Cette diversité fait des CLRs une cible

très importante dans le domaine de la vaccination pour moduler la réponse immunitaire.

Plusieurs possibilités ont été étudiées pour déclencher les CLR_s afin d'induire une réponse immunitaire spécifique: l'utilisation de pathogènes morts ou atténués, de ligands glucidiques, ou de particules contenant à la fois des ligands glucidiques et adjuvants. Bien que des pathogènes comme *M. bovis* BCG et des virus atténués aient été utilisés avec succès dans la conception de vaccins (Pulendran et al. 2013), il existe des problèmes liés au large spectre des différents CLR_s qui peuvent être déclenchés en même temps, et également aux possibles interactions avec d'autres PRR_s. Il est donc difficile de prédire le type de réponse immunitaire qui sera suscitée et donc l'efficacité du vaccin.

Une alternative pourrait donc être l'utilisation de glucides de structure simple, de glycoprotéines ou de glycolipides microbiens. Par exemple, les β -glucanes sont de bons candidats car ils sont spécifiquement reconnus par DECTIN-1 et induisent la réponse immune Th1 et Th17 à l'infection par *Candida albicans* (Taylor et al. 2007; Gringhuis, den Dunnen, Litjens, van der Vlist, Wevers, et al. 2009). En outre, les β -glucanes ont été utilisés avec succès pour améliorer également la réponse anti-tumorale à travers la réponse T cytotoxique (Leibundgut-Landmann et al. 2008). Par ailleurs, le ligand spécifique du récepteur Mincle-MCL, le TDM mycobactérien, a été utilisé avec succès pour vacciner contre les infections mycobactériennes chez la souris (Werninghaus et al. 2009; Behler et al. 2015). Également, l'utilisation de glycoprotéines virales spécifiques de récepteurs comme DC-SIGN et DCIR en combinaison avec des ligands de TLR_s modulent la signalisation innée et par conséquent la réponse adaptative. Par exemple, il a été montré que l'activation de DC-SIGN par l'HIV-1 induit le recrutement par le complexe « signalosome » des protéines effectrices qui vont activer Raf-1 impliquée dans la modulation positive de la réponse immune induit par les TLR_s (Gringhuis, den Dunnen, Litjens, van der Vlist, and Geijtenbeek 2009). Par ailleurs, l'équipe d'Adema GJ a mis en évidence l'internalisation de DCIR et sa localisation intracellulaire au niveau des endosomes et des lysosomes suite à la stimulation par des anticorps spécifiques. Cette internalisation est associée à

l'inhibition de la production d'IL-12 et du TNF- α induit par le TLR-8 (Meyer-Wentrup et al. 2009b).

Cependant, les glucides de structure simple sont parfois reconnus par plusieurs CLRs et ne peuvent pas être utilisés pour induire une réponse spécifique d'un seul CLR.

C'est pourquoi d'autres mécanismes ont été envisagés comme l'utilisation d'anticorps dirigés contre les CLRs. Ces anticorps sont par définition plus spécifiques que les ligands précédemment cités. Par exemple l'anticorps 24/04-10B4 dirigé contre CLEC9A a été montré comme étant capable d'induire la réponse cellulaire Tfh (Kato et al. 2015). Également, l'anticorps polyclonal H-200 dirigé contre DC-SIGN a été montré comme étant capable d'induire la même signalisation que les ligands de mannose spécifiques de DC-SIGN (Hodges et al. 2007b).

Récemment, il a été montré que l'utilisation de l'anticorps 3BNC117 dirigé contre le site de liaison de la capsid virale du HIV-1 avec les cellules T CD4⁺ protège de l'infection par le HIV-1 (Caskey et al. 2015). En outre, la sélection des lymphocytes B liée aux cellules Tfh dans les centres germinatifs est nécessaire pour former ces anticorps largement neutralisants (Streeck et al. 2013). Par conséquent, les vaccins qui induisent une réponse Tfh efficace pourraient permettre l'émergence d'Ac neutralisant l'infection des cellules CD4 par le HIV-1. Ainsi, la recherche de vaccin basé sur des anticorps dirigés contre les CLRs qui, à la différence d'autres PRRs, présentent l'avantage d'induire spécifiquement des réponses Tfh, est prometteur.

En reconnaissant des ligands endogènes, les CLRs agissent aussi comme des acteurs importants de la régulation de l'inflammation stérile qui peut faire suite à une infection ou à un traumatisme tissulaire. Les CLR peuvent détecter des dommages tissulaires via les DAMPs et agir sur la balance entre la réponse inflammatoire et la réponse résolutive. La dérégulation de cette balance peut conduire à l'oncogenèse et à la pathogenèse de maladies auto-immunes et allergiques. Étant donné leurs mécanismes immunorégulateurs, les CLR représentent une approche translationnelle pour traiter une grande variété de maladies inflammatoires.

Dans le domaine de la cancérologie, les CLRs sont ciblés dans le but d'améliorer la cross-présentation d'antigènes et donc l'activation de la réponse T CD8⁺ cytotoxique

contre la tumeur (Fehres et al. 2014). Les tumeurs présentent des aberrations dans le processus de glycosylation de protéines, par exemple certaines tumeurs expriment des antigènes fucosylés et de l'acide sialique qui induisent une suppression de la réponse immunitaire (Perdicchio et al. 2016; Chen et al. 2015). C'est pour cette raison que les vaccins qui ont pour objectif d'inverser l'environnement tumoral immunosuppresseur offrent une stratégie très efficace. Par exemple, le ciblage de DECTIN-1 pour induire les réponses immunes Th1 et Th17 spécifiques de la protéine ovalbumine (OVA) a été efficace pour contrôler/inhiber le développement d'une tumeur exprimant l'OVA chez la souris (Leibundgut-Landmann et al. 2008). Récemment, l'équipe de George Miller a démontré que l'activation de DECTIN-1, exprimé par les macrophages suite à la reconnaissance de la protéine Galectine 9, induit la tolérance immunitaire à l'adénocarcinome pancréatique. Pour cette étude, ils ont analysé le phénotype des lymphocytes T provenant des ganglions lymphatiques drainant du pancréas chez les souris KC qui développent une néoplasie pancréatique endogène. Ils ont observé qu'en absence de DECTIN-1, les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ qui drainent la tumeur surexpriment les molécules d'activation cellulaire CD44, OX40 et PD-1. En outre, l'activité cytotoxique est augmentée en l'absence de DECTIN-1 par la surexpression de PD-1, T-bet, TNF- α , CD107a et granzyme B par les lymphocytes T CD8⁺. Ils ont aussi observé que la polarisation de la réponse Th1 est favorisée par la surexpression de T-bet et TNF- α par les lymphocytes T CD4⁺. Finalement ils ont démontré que l'augmentation de la réponse T anti-tumoral est associée à la reconnaissance de la Galectine 9 par DECTIN-1 dépendante des macrophages (Daley et al. 2017). Mincle est une autre CLR décrit dans la littérature pour reconnaître un ligand endogène, la protéine SAP130, une enzyme cytoplasmique exprimée dans l'adénocarcinome pancréatique induit par les protéines RIP1 et RIP3 impliquées dans la nécrose cellulaire. La reconnaissance de SAP130 par Mincle favorise l'immunosuppression adaptative induite par les macrophages. La délétion de Mincle chez les souris KC est associée à une infiltration plus élevée de cellules T immunogènes dans la tumeur, ainsi qu'une diminution de l'infiltration des « Myeloid-derived suppressor cells » (MDSC) et des « Tumor-associated macrophage » (TAM) qui se polarisent en M1, et une réduction de l'expression de PD-L1. En absence de Mincle, le microenvironnement

suppresseur de la tumeur est reprogrammé favorisant ainsi la réponse immunitaire contre la tumeur (Seifert et al. 2016).

Cependant, il existe d'autres antigènes tumoraux reconnus et internalisés par médiation des CLR qui en lieu de favoriser la présentation d'antigènes par les DCs et potentialiser la réponse immunitaire, ils restent bloqués dans les compartiments intracytoplasmiques. Cette rétention des Ags au niveau intracellulaire entraîne une faible présentation d'antigènes et donc une réponse contre la tumeur moins importante. Par exemple, la glycoprotéine « tumor-derived mucin » MUC-1, qui contient plusieurs résidus de mannose et galactose est reconnue et internalisée par médiation du CLR « Macrophage galactose lectin » (MGL). Cette protéine reste bloquée dans les endosomes et elle n'est pas dégradée ce que limite sa présentation par les DCs à travers du CMH-II (Hiltbold et al. 2000). Cela peut donc être un obstacle fréquent à la présentation des Ags tumoraux et une considération importante dans la conception des vaccins anticancéreux. Il devrait être possible de surmonter cet obstacle en fournissant aux DCs une forme d'Ag tumoral qui peut être mieux traitée. La rétention de MUC-1 pourrait être dû à la présence des plusieurs glucides qui constituent cette protéine qui peuvent déclencher plusieurs récepteurs et donc bloqué le correcte traitement intracellulaire de MUC-1. Pour MUC-1, cette étude à montré qu'un polypeptide synthétique de 140 aminoacides non glycosylé est très efficacement traité par les DCs et induit une forte réponse Th anti-tumorale (Hiltbold et al. 2000). Par ailleurs, ils ont montré que le degré de glycosylation de MUC-1 était également important dans la cross-présentation à travers du CMH-I et dans activation de la réponse T cytotoxique. L'efficacité du traitement et la force résultante de l'activité cytotoxique par médiation des lymphocytes T étaient inversement corrélées avec le degré de glycosylation de l'antigène (Hiltbold et al. 1999).

III. Le « C-type lectin-like receptor-1 » (CLEC-1)

1. Généralités

Jusqu'à présent, le « C-type lectin-like receptor-1 » (CLEC-1) a été peu décrit dans la littérature. CLEC-1 a été identifié comme un récepteur sur-exprimé dans un modèle de tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat (Pamela Thebault et al. 2009). Ce récepteur fait partie de la sous-famille de récepteurs lectine-like de type C appelée DECTIN-1 (Sobanov et al. 2001). Cet ensemble de récepteurs est localisé dans un complexe génétique, le « NK gene complex » (NKC) qui code pour de nombreux récepteurs aux fonctions très importantes dans l'immunologie des monocytes, cellules dendritiques et cellules endothéliales.

CLEC-1 a été identifié et décrit au niveau structurel par prédictions bioinformatiques en même temps que « C-type lectin-like receptor-2 » (CLEC-2) qui est beaucoup plus étudié au niveau fonctionnel dans la bibliographie (Colonna, Samaridis, and Angman 2000). Ces deux récepteurs ont une structure très similaire non classique par rapport aux autres membres de cette famille et sont très conservés au niveau évolutif. Cette étude bioinformatique a permis d'approfondir la structure de CLEC-1 ce qui permet d'en déduire de possibles fonctions immunologiques. CLEC-1 pourrait avoir donc un rôle très important dans le système immunitaire.

2. Structure et homologie des CTLRs CLEC-1 et CLEC-2

Deux nouvelles séquences d'ADN codantes pour des récepteurs transmembranaires lectin-like de type C, CLEC-1 et CLEC-2, ont été identifiées. Les structures de CLEC-1 et CLEC-2 ont été décrites par prédictions bioinformatiques suite à une étude d'alignement et de comparaison de séquences provenant de la base de données « Gen Bank expressed sequence tagged data base » (dbEST) (Colonna, Samaridis, and Angman 2000) (Figure 12).

CLEC-1 et CLEC-2 sont des protéines transmembranaires de type II. Ils ne disposent pas de séquence signal dans le domaine N-terminal mais ils présentent une région codante pour un domaine transmembranaire hydrophobe. Ils présentent aussi

III. C-type lectin-like receptor-1 (CLEC-1)

un seul « carbohydrate recognition domain » (CRD). L'alignement des CRDs de CLEC-1 et CLEC-2 avec les CRDs de récepteurs homologues a montré la présence de six résidus de cystéine très conservés, qui sont impliqués dans la formation de trois liaisons disulfure intra-chaîne et donc dans la conformation protéique du CRD. CLEC-1 a deux cystéines en plus qui permettent une liaison intra-chaîne supplémentaire. Les deux récepteurs contiennent une cystéine au début du CRD et une autre cystéine dans la région qui connecte le CRD avec le domaine cytoplasmique, le « Neck region ». Ces résidus peuvent être impliqués dans l'homo- ou l'hétéro-dimérisation du récepteur par la formation de liaisons disulfure inter-chaînes. Les CRDs de CLEC-1 et CLEC-2 ne présentent pas de résidu d'acide aminé essentiel pour la reconnaissance des carbohydrates de manière dépendante au calcium, ce qui suggère la reconnaissance de ligands autres que les glucides, ou de glucides mais de façon indépendante du calcium (Colonna, Samaridis, and Angman 2000).

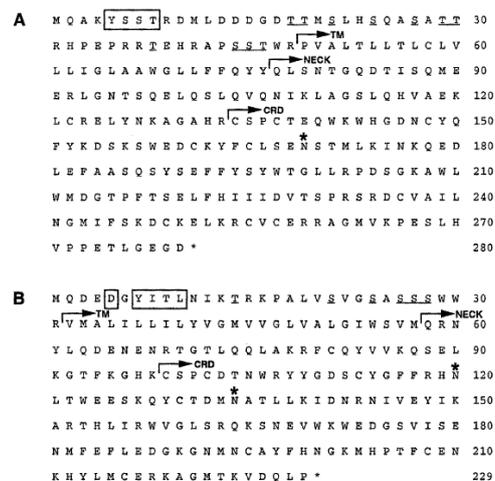


Figure 12. Séquences d'acides aminés de CLEC-1 et CLEC-2.

D'après Colonna, Samaridis and Angman (Colonna, Samaridis, and Angman 2000).

Le « carbohydrate recognition domain » (CDR) de la région C-terminal est connecté avec le domaine transmembranaire (TM) de la région N-terminal par le domaine appelé « Neck region » (NK).

Cette étude bioinformatique a également montré la présence d'un résidu de tyrosine dans les domaines cytoplasmiques de CLEC-1 et CLEC-2. La tyrosine cytoplasmique de CLEC-1 fait partie d'un motif composé d'une séquence d'acides

aminés Y-S-S-T dont la fonction n'a pas encore été décrite, alors que celle de CLEC-2 fait partie d'un motif composé d'une séquence d'acides aminés D-x-Y-x-x-L décrite comme étant essentielle pour l'endocytose et l'expression basolatérale du récepteur des asialoglycoprotéines (« asialoglycoprotein receptors » ou ASGPR-1). Ainsi CLEC-1 et CLEC-2 contiennent des résidus de sérine et thréonine potentiellement phosphorylables dans leur domaine cytoplasmique ce qui permet le recrutement de protéines essentielles pour l'activation des voies de signalisation (Colonna, Samaridis, and Angman 2000).

La connaissance de la structure de CLEC-1 oriente les recherches quant à sa fonction qui doit être importante étant donnée sa conservation entre les espèces.

3. Localisation chromosomique et phylogénie de CLEC-1

Par des techniques de cartographie génétique, il a été montré que les gènes codants pour CLEC-1 et CLEC-2 font partie d'un complexe génétique, le « NK gene complex » (NKC) situé sur le chromosome 12 chez l'homme et sur le chromosome 6 chez la souris (Sobanov et al. 2001) (Figure 13). Les gènes CLEC-1, CLEC-2 et DECTIN-1 sont étroitement liés avec le gène LOX-1 et montrent une même orientation dans le complexe. Les séquences de CDRs de ces quatre gènes ont été alignées et comparées avec d'autres CDRs provenant de différents gènes du complexe NKC pour une construction phylogénique. Cette analyse a permis d'identifier une sous-famille où sont regroupés les gènes CLEC-1 et CLEC-2 (avec une homologie de 37%) et les gènes DECTIN-1 et LOX-1 (avec une homologie de 44%). Cette sous-famille a été appelée « DECTIN-1 Cluster » et elle est composée des gènes codant pour les CTLRs (Xie 2012): DECTIN-1, CLEC-2 et CLEC-9A, récepteurs avec un domaine intracytoplasmique ITAM ; « Myeloid Inhibitory C-type-like Lectin » (MICL/CLEC-12A), « Macrophages Antigen H » (MAH/CLEC-12B), récepteurs avec un domaine intracytoplasmique ITIM ; et « Lectin-like Oxidised LDL receptor-1 » (LOX-1) et CLEC-1 avec des domaines intracytoplasmiques non classiques.

III. C-type lectin-like receptor-1 (CLEC-1)

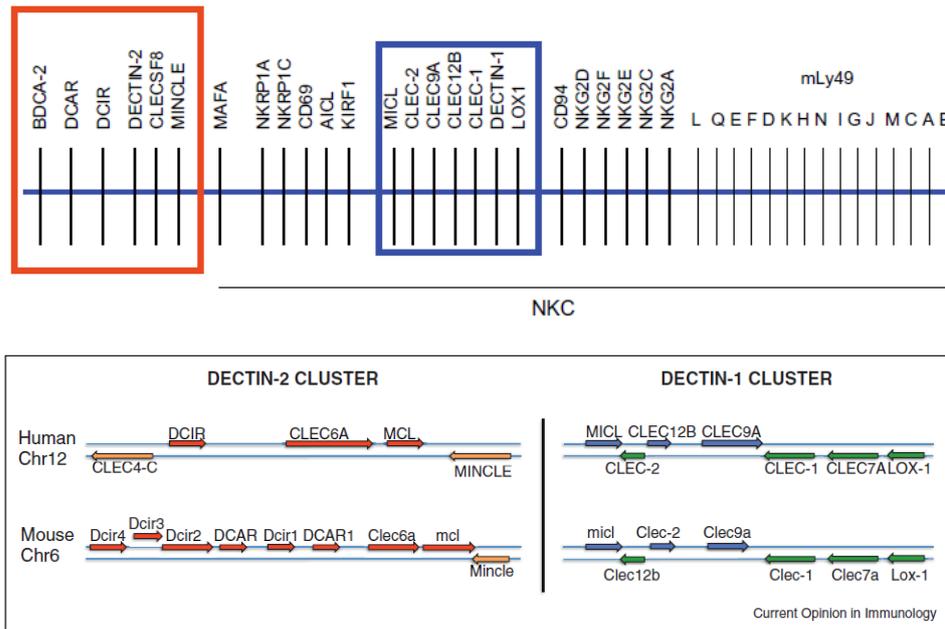


Figure 13. Organisation de « DECTIN-1 cluster » dans le complexe NK.

D'après Dambuzza and Brown (Dambuzza and Brown 2015).

Organisation et orientation des gènes codant pour CLEC-1 et CLEC-2 du « DECTIN-1 cluster » dans le complexe NK chez l'homme et chez la souris.

La sous-famille DECTIN-1 fait partie du groupe V des CTLRs. Ces récepteurs sont tous caractérisés par l'absence de motif de liaison aux carbohydrates, mais en revanche, ils reconnaissent un large spectre de ligands de façon indépendante du calcium. Ils sont exprimés principalement, mais pas seulement, par les cellules myéloïdes comme les DCs, les macrophages et les neutrophiles et vont accomplir des fonctions très importantes dans l'immunité et dans l'homéostasie.

4. Profils d'expressions tissulaire et cellulaire de CLEC-1 chez l'homme

Une très forte expression de CLEC-1 a été montrée dans un premier temps par Northern Blot chez l'homme dans le tissu placentaire et le poumon. CLEC-1 est exprimé de façon plus modérée dans le thymus et le cœur, et très faiblement dans le pancréas, le foie, la vessie, la prostate, les ovaires, l'intestin grêle et le colon. La distribution de l'expression tissulaire de CLEC-1 suggère une expression de CLEC-1 préférentielle par les DCs et les macrophages dans le placenta et le poumon, par les

cellules épithéliales thymiques, et par les cellules endothéliales dans le cœur. Plus tard, par la technique de RT-PCR, il a été montré chez l'homme, que CLEC-1 était fortement exprimé par les cellules endothéliales et les cellules dendritiques interstitielles (intDCs), et plus faiblement par les cellules de Langerhans (LC), les cellules dendritiques myéloïdes (mDC), et cellules dendritiques dérivées de monocytes (MoDC). Il est aussi exprimé par les monocytes et les granulocytes, mais en revanche, il n'a pas été détecté dans les cellules B, T, NK, ni dans les plaquettes (Colonna, Samaridis, and Angman 2000; Sattler et al. 2012).

Pour déterminer la présence de CLEC-1 à la surface cellulaire, CLEC-1 tagué au peptide V5 a été transfecté dans des cellules COS et analysé par cytométrie en flux en utilisant l'anticorps spécifique pour V5 (Colonna, Samaridis, and Angman 2000). Il a ainsi été montré que CLEC-1 était présent uniquement au niveau intracellulaire. Ces résultats ont suggéré la nécessité de l'interaction de CLEC-1 avec une autre molécule pour former un hétérodimère stable au niveau de la membrane, ou alternativement, un rôle intracellulaire de CLEC-1.

5. Rôle potentiel de CLEC-1 en transplantation

Au sein de notre équipe, un modèle de tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat a été mis en place par un court traitement avec le LF15-0195, un analogue de la deoxys-pergualine (Chiffolleau et al. 2002b, 2002a). Dans la même combinaison d'allogreffes, le traitement préalable des receveurs par transfusion de sang du donneur permet d'éviter le développement du rejet aigu. Cependant, le rejet chronique se développe et cela nous a permis de comparer des greffons tolérants versus des greffons en rejet chronique à 100 jours après la transplantation.

Afin d'identifier de nouvelles molécules immunorégulatrices, les transcriptomes des greffons tolérés à long terme (traitement LF15-0195) et des greffons en rejet chronique (traitement DST) ont été comparés par puce à ADN. La surexpression de plusieurs molécules cytoprotectrices spécifiques aux cellules endothéliales des vaisseaux du greffon toléré, ainsi que l'infiltration et l'accumulation de cellules T

régulatrices, ont été mis en évidence (Heslan et al. 2006; P. Thebault et al. 2007). CLEC-1 fait partie des gènes surexprimés dans le greffon toléré.

La surexpression de CLEC-1 a été confirmée au niveau des transcrits dans ce modèle de tolérance, en comparaison à un modèle de greffe syngénique et à deux modèles de rejet chronique d'allogreffe induits par transfusion de sang avant la greffe ou de protéine recombinante CD40Ig (Pamela Thebault et al. 2009). CLEC-1 a également été montré comme étant surexprimé dans un modèle de tolérance à l'allogreffe de rein induite par l'administration d'anticorps anti-CMH-II du donneur. Egalement le modèle de tolérance par le LF15-0195 a montré une augmentation au niveau du greffon de l'expression des molécules «Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygénase » (IDO) et de FoxP3 impliqués dans l'inhibition de la réponse T (Jovanovic et al. 2008; Degauque et al. 2006).

Un anticorps polyclonal dirigé contre le domaine extracellulaire de CLEC-1 de rat a été généré par l'équipe (Pamela Thebault et al. 2009). Par immunofluorescence, il a également été montré la sur-expression de CLEC-1 par les cellules myéloïdes (CD172+) et par les cellules endothéliales (PECAM-1+) présentes dans les greffons tolérés.

Ces résultats ont suggéré le rôle important de CLEC-1 dans la régulation de la réponse immune pourrait représenter un outil thérapeutique dans les domaines de la transplantation, auto-immunité et cancérologie.

L'expression de CLEC-1 a été caractérisée chez les rats naïfs (Pamela Thebault et al. 2009). Au niveau tissulaire, il est très fortement exprimé (en transcrit et en protéine) dans le poumon, de façon modérée dans les organes lymphoïdes secondaires comme la rate et les ganglions lymphatiques et faiblement exprimé dans le thymus et le cœur. Au niveau cellulaire il est exprimé dans les BMDCs et dans les macrophages péritonéaux, et plus faiblement dans une lignée de cellules endothéliales et dans les DCs spléniques. En revanche, les cellules T n'expriment pas CLEC-1. Par immunofluorescence, en utilisant l'anticorps polyclonal spécifique de CLEC-1, son expression protéique a été montrée dans les DCs, macrophages et cellules endothéliales. En outre, comme d'autres CLRs régulateurs de la réponse immune, l'expression de CLEC-1 est aussi régulée en fonction des différents stimuli. La

stimulation par des molécules pro-inflammatoires comme le LPS, l'INF- γ et le Poly (I:C) induit une diminution de l'expression alors qu'elle est augmentée par des cytokines anti-inflammatoires comme IL-10 et TGF- β (Pamela Thebault et al. 2009).

La similitude des profils d'expression de CLEC-1 chez le rat, montré par l'équipe, et chez l'homme, décrit par d'autres équipes (Colonna, Samaridis, and Angman 2000), conforte notre modèle de rat comme un modèle solide pour étudier la fonctionnalité de CLEC-1 et établir une preuve de concept préalable à l'étude de CLEC-1 chez l'homme.

Plusieurs expériences ont été mises en place pour étudier la fonction de CLEC-1. Précédemment, il a été montré in vivo et in vitro le rôle des cellules régulatrices T CD4⁺ CD25⁺ dans la tolérance via leur interaction avec les cellules endothéliales du greffon et l'induction de molécules immunosuppressives (P. Thebault et al. 2007). Par la suite, il a été montré in vitro que les cellules régulatrices T CD4⁺ CD25⁺ provenant des receveurs tolérants leur allogreffe induisaient l'augmentation de l'expression de CLEC-1 dans une lignée de cellules endothéliales du donneur (LEW 1W). Cette induction nécessite le contact direct entre les cellules. De plus, le transfert in vivo de ces cellules régulatrices a confirmé cet effet, c'est-à-dire que les cellules régulatrices T CD4⁺ CD25⁺ infiltrées dans le greffon et activées par les alloantigènes induisent une augmentation locale de l'expression de CLEC-1 dans les APCs et cellules endothéliales du donneur (Pamela Thebault et al. 2009).

De façon intéressante, il a été montré que CLEC-1 dans les cellules dendritiques altère secondairement l'activation des cellules T. En effet, l'inhibition de CLEC-1 par la technique de RNA interférents dans des BMDCs de rat ne module pas la production des cytokines IL-12p70, IL-6 ou IL-10, ni l'expression de CMH-II, CD86 ou CD80 après stimulation au LPS ; cependant, l'inhibition de CLEC-1 dans les BMDCs a montré dans les lymphocytes T allogéniques suite à une MLR, une augmentation de la production d'IL-17 et de l'expression du facteur de transcription ROR- γ (liés aux cellules Th17). En revanche, cette inhibition a diminuée la production secondaire des cytokines IL-13 et INF- γ impliquées respectivement dans les réponses Th2 et Th1. Egalement, l'expression du facteur de transcription FoxP3 a été diminué sans moduler la production de TGF- β . Cependant, l'inhibition de CLEC-1 dans les BMDCs ne semblait

III. C-type lectin-like receptor-1 (CLEC-1)

pas modifier la prolifération des cellules T CD4⁺ effectrices ni régulatrices isolées in vitro. Ces données montrent donc que CLEC-1 dans les BMDCs altère la réponse secondaire des cellules T allogéniques en diminuant la différenciation des cellules Th17 et en augmentant le nombre de cellules T régulatrices. Cependant, cet effet n'est pas dû à une action directe de CLEC-1 sur la différenciation des LT, mais pourrait être dû à un effet par médiation des cellules T régulatrices à travers de la sécrétion du TGF- β qui induit la surexpression de CLEC-1 (Pamela Thebault et al. 2009).

Ce travail avait permis de mieux caractériser CLEC-1 chez le rat, et suggérait que CLEC-1 est un récepteur capable de moduler la réponse immunitaire adaptative. CLEC-1 pourrait donc être utilisé comme une cible thérapeutique dans le contexte de la transplantation, de l'auto-immunité et de la cancérologie.

Les objectifs du projet étaient:

- L'étude de l'expression de CLEC-1 dans les différents types et sous-types cellulaires chez l'homme et sa fonctionnalité plus particulièrement dans les cellules dendritiques. Pour cette étude, un anticorps monoclonal dirigé contre le domaine extracellulaire de CLEC-1 humain a été généré. Cet anticorps nous permettra d'abord d'analyser l'expression et la localisation cellulaire de notre molécule d'étude, et ensuite, de mimer le ligand de CLEC-1 dans le but d'investiguer *in vitro* sa signalisation et sa fonctionnalité dans la réponse T adaptative.
- Une étude *in vitro* et *in vivo* de la fonctionnalité de CLEC-1 dans les cellules dendritiques chez le rat. Plusieurs outils ont été générés pour cette partie du projet dans le but de bloquer la signalisation induite par CLEC-1 ou son expression. L'équipe avait généré une protéine de fusion composée du domaine extracellulaire de CLEC-1 de rat et d'un fragment Fc d'IgG2a de souris muté sur 3 acides aminés pour empêcher son accrochage aux récepteurs Fc des immunoglobulines. Ce récepteur soluble nous a permis de bloquer l'interaction du récepteur CLEC-1 avec son ligand en occupant le ligand encore inconnu de CLEC-1. Egalement, nous avons fait générer par la plate-forme TRIP, dirigée par Ignacio Anegón, des rats Knock Out (KO) Lewis A par la technique des « Zinc FingerNuclease » (ZFN). Ces rats ont permis d'abord de générer des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BMDC) n'exprimant pas de CLEC-1 pour des expériences *in vitro*, et ensuite la mise en place de modèles d'immunisation *in vivo* pour investiguer le rôle de CLEC-1 dans la réponse T adaptative et conforter les data *in vitro* obtenues précédemment dans l'étude de la fonctionnalité de CLEC-1 par l'équipe.

Article accepté dans « Blood advances », en 2017.

« Cell-surface C-type lectin-like receptor CLEC-1 dampens dendritic cell activation and downstream Th17 responses »

Maria Dolores Lopez Robles, Annaick Pallier, Virginie Huchet, Laetitia Le Texier, Severine Remy, Cecile Braudeau, Laurence Delbos, Aurelie Moreau, Cedric Louvet, Carole Brosseau, Pierre-Joseph Royer, Antoine Magnan, Franck Halary, Regis Josien, Maria-Cristina Cuturi, Ignacio Anegon, et Elise Chiffolleau.

Résumé :

Les cellules dendritiques (DCs) sont essentielles pour connecter l'immunité innée et adaptative et orienter les réponses des lymphocytes T. Les récepteurs Lectin de type-C présents dans les DCs sont activés par des ligands exogènes et endogènes, ce qui dicte la réponse aux agents pathogènes par la modulation de la réponse T immunitaire. Nous avons déjà décrit chez le rat, l'expression de CLEC-1 dans les DCs et nous avons démontré in vitro son rôle inhibiteur dans l'activation de la réponse T helper (Th17) (Thebault et al. 2009). Dans cette étude, nous avons examiné l'expression et la fonction de CLEC-1 dans les DCs humaines et nous avons montré son expression à la surface cellulaire de la sous-population de DCs CD16⁻ dans le sang et sur les DCs dérivées des monocytes (moDCs). L'expression de CLEC-1 sur les moDCs est diminuée par des stimuli inflammatoires et renforcée par le TGF- β . De plus, nous avons démontré que CLEC-1 est un récepteur fonctionnel sur les moDCs humains et que, bien qu'il ne module pas la voie classique d'activation du facteur de transcription NF κ B lié à la protéine kinase Syk, il réprime la réponse ultérieure Th17. De façon très importante, en utilisant des rats déficients pour CLEC-1, nous avons montré que la perturbation de la signalisation de CLEC-1 conduit à une surexpression de la sous-unité Il-12p40 dans les DCs, et à une exacerbation des réponses CD4⁺ Th1 et Th17 in vitro et in vivo. Collectivement, nos résultats établissent le rôle inhibiteur de CLEC-1 dans les DCs, capable d'amortir leur activation et la réponse ultérieure Th17. CLEC-1 peut représenter une cible thérapeutique utile pour moduler les réponses immunitaires T dans un contexte clinique.

Cell-surface C-type lectin-like receptor CLEC-1 dampens dendritic cell activation and downstream Th17 responses

Maria Dolores Lopez Robles,¹⁻⁴ Annaick Pallier,¹⁻⁴ Virginie Huchet,¹⁻⁴ Laetitia Le Texier,⁵ Severine Remy,¹⁻⁴ Cecile Braudeau,^{1,2,6} Laurence Delbos,¹⁻⁴ Aurelie Moreau,¹⁻⁴ Cedric Louvet,¹⁻⁴ Carole Brosseau,^{3,7} Pierre-Joseph Royer,^{3,7} Antoine Magnan,^{3,7} Franck Halary,¹⁻⁴ Regis Josien,^{1-4,6,8} Maria-Cristina Cuturi,¹⁻⁴ Ignacio Aneon,¹⁻⁴ and Elise Chiffolleau¹⁻⁴

¹Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie UMR1064, INSERM, Université de Nantes, Nantes, France; ²Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), CHU Nantes, Nantes, France; ³IHU Cesti, Nantes, France; ⁴LabEx IGO Immunotherapy Graft, Oncology, Nantes, France; ⁵Immunology Department, QIMR Berghofer Medical Research Institute, Brisbane, QLD, Australia; ⁶CIMNA, Laboratoire d'Immunologie, CHU Nantes, Nantes, France; and ⁷Institut du thorax UMR1087, INSERM, and ⁸Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France

Key Points

- CLEC-1 is restricted to CD16[−] myeloid DCs in human blood and acts as an inhibitory receptor to restrain downstream Th17 activation.
- CLEC-1-deficient rats highlight an *in vivo* function for CLEC-1 in preventing excessive T-cell priming and effector Th responses.

Dendritic cells (DCs) represent essential antigen-presenting cells that are critical for linking innate and adaptive immunity, and influencing T-cell responses. Among pattern recognition receptors, DCs express C-type lectin receptors triggered by both exogenous and endogenous ligands, therefore dictating pathogen response, and also shaping T-cell immunity. We previously described in rat, the expression of the orphan C-type lectin-like receptor-1 (CLEC-1) by DCs and demonstrated *in vitro* its inhibitory role in downstream T helper 17 (Th17) activation. In this study, we examined the expression and functionality of CLEC-1 in human DCs, and show a cell-surface expression on the CD16[−] subpopulation of blood DCs and on monocyte-derived DCs (moDCs). CLEC-1 expression on moDCs is downregulated by inflammatory stimuli and enhanced by transforming growth factor β . Moreover, we demonstrate that CLEC-1 is a functional receptor on human moDCs and that although not modulating the spleen tyrosine kinase-dependent canonical nuclear factor- κ B pathway, represses subsequent Th17 responses. Interestingly, a decreased expression of *CLEC1A* in human lung transplants is predictive of the development of chronic rejection and is associated with a higher level of interleukin 17A (*IL17A*). Importantly, using CLEC-1-deficient rats, we showed that disruption of CLEC-1 signaling led to an enhanced *Il12p40* subunit expression in DCs, and to an exacerbation of downstream *in vitro* and *in vivo* CD4⁺ Th1 and Th17 responses. Collectively, our results establish a role for CLEC-1 as an inhibitory receptor in DCs able to dampen activation and downstream effector Th responses. As a cell-surface receptor, CLEC-1 may represent a useful therapeutic target for modulating T-cell immune responses in a clinical setting.

Introduction

Dendritic cells (DCs) are the sentinels of the immune system that are potentially activated to mediate efficient T-cell priming via a set of pattern-recognition receptors (PRRs). These receptors comprise the C-type lectin receptors (CLRs) that are able to recognize exogenous pathogen-associated molecular patterns, which are common to many types of bacteria, fungi, viruses, helminths, and also endogenous self-ligands of dying cells or glycans.^{1,2} The C-type lectin-like receptors (CTLRs) represent subtypes of these receptors, which lack the residues required for calcium-dependent carbohydrate binding and that by alternative mechanisms, recognize more diverse ligands such as proteins and lipids.³ Following

triggering, most CLR s expressed on DCs modulate nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation via the spleen tyrosine kinase (SYK) signaling pathway to enhance or suppress cellular activation, and fine-tune the magnitude and quality of downstream T-cell responses.³ We previously identified the CTLR, C-type lectin-like receptor-1 (CLEC-1), to be upregulated in a heart allograft model of tolerance in rats.⁴ We demonstrated that CLEC-1 is expressed by rat myeloid and endothelial cells (ECs), and is downregulated by pro-inflammatory stimuli and enhanced by transforming growth factor β (TGF- β). Moreover, our in vitro studies demonstrated that CLEC-1 inhibition in rat DCs via RNA interference enhanced subsequent DC-mediated CD4⁺ T helper 17 (Th17) activation.⁴ CLEC-1 belongs to the DC-associated C-type lectin-1 (DECTIN-1) cluster of CTLRs, and although identified a long time ago,^{5,6} corresponding exogenous and endogenous ligands are unknown and downstream signaling remains uncharacterized. CLEC-1 does not contain an immunoreceptor tyrosine-based activation or inhibitory motif in the cytoplasmic tail, but rather a tyrosine residue in a noncharacterized signaling sequence [YSST], in addition to a tri-acidic motif [DDD].^{3,7} In humans, CLEC-1 protein was reported to be expressed intracellularly in ECs.⁸ Nevertheless, its protein expression in human DCs as well as its biological effect remains uncharacterized. In this study, we have investigated CLEC-1 protein expression and regulation in human DCs, and its functional role on orchestration of T-cell responses. In addition, using CLEC-1-deficient rats and CLEC-1 fragment constant (Fc) fusion protein, we evaluated in vitro and in vivo, the consequence of CLEC-1 signaling disruption on DC function and downstream T-cell immunity.

Materials and methods

Patient and healthy donor material

Blood was obtained from healthy donors. Lung transplant biopsies from stable patients and from patients prior to chronic rejection (CR) were obtained from the multicentric longitudinal cohort "COhort in Lung Transplantation" (#NCT00980967). All material of healthy donors and patients was obtained after written informed consent, according to institutional guidelines.

Animals

Male 6- to 8-week-old LEW.1A (RT1a) and fully major histocompatibility complex-mismatched LEW.1W (RT1u) rats were purchased from the Centre d'Élevage Janvier (Genest, Saint-Isle, France), and experimental procedures were carried out in strict accordance with the protocols approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of Pays de la Loire and authorized by the French Government's Ministry of Higher Education and Research. *Clec1a* knockout rats were generated in the inbred LEW.1A background by the Transgenic Rats and Immunophenomics Platform facility (Structure Fédérative de Recherche [SFR]-Nantes) with the zinc finger nucleases technology (supplemental Figure 1). Absence of CLEC-1 at the expected size of 32 kDa was confirmed by western blot (supplemental Figure 2). For each experiment, 6- to 12-week-old sex-matched wild-type (WT) and CLEC-1-deficient (knockout) littermate rats were used.

For generation of chimeric rats, 50 million hematopoietic cells from WT or CLEC-1-deficient rats were IV injected into WT lethally irradiated rats (9 Gy, X-ray [SFR] day -1).

Antibodies

Anti-human CLEC-1 monoclonal antibody (anti-hCLEC-1 mAb, immunoglobulin G1 [IgG1]) was generated by Biotem (Apprieu, France) by lymphocyte somatic hybridization by immunization of Balb/c mice with a peptide encoding the extracellular domain of hCLEC-1 (CERRAGMVKPESLHVPPETLGGED), screened by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (hCLEC-1 protein;

R&D Systems, Minneapolis, MN) and purified by chromatography on protein A. Anti-hCLEC-1 mAb (IgG1-D6) was purchased from Santa Cruz (Dallas, TX). Purified anti-rat CD3 (G4.18), anti-rat T-cell receptor $\alpha\beta$ -Alexa647 or -Alexa488 (R73), CD4-PECy7 (OX35), interleukin-17 (IL-17)-allophycocyanin (APC) (ebio17B7), interferon γ (IFN- γ)-phycoerythrin (PE), and anti-human phosphotyrosines (p-Tyr) (4G10), CD4-PE, CD3-APC or CD3-fluorescein isothiocyanate (FITC), CD45-PerCP, CD16-PE or -FITC, CD209-PE, CD14-FITC, HLA-antigen D related (HLA-DR)-APC/Cy7 or -FITC, CD11c-PECy7, CD11b-FITC, CD80-FITC, CD86-FITC, CD83-FITC, and IgG1 isotype control were all purchased from BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ). Phospho-I κ B α (Ser32/36) (5A5) and I κ B α mAbs were from Cell Signaling (Danvers, MA). Secondary mAbs were from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA).

Flow cytometry and cell sorting

Before staining, cells were subjected to Fc block (BD Biosciences). For intracellular cytokine staining, cells were stimulated for 4 hours with phorbol 12-myristate 13-acetate (50 ng/mL), ionomycin (1 μ g/mL) in the presence of GolgiStop, and subjected to fixation and permeabilization (all reagents from BD Biosciences). Fluorescent labeling of stained cells (2.5 μ g/mL) was measured using a fluorescence-activated cell sorter LSR II (BD Biosciences) and analyzed with FloJo software (Tree Star Inc., Ashland, OR).

For cell sorting, total or CD4⁺ T cells were purified from the spleen of naïve LEW.1A rats by positive selection by T-cell receptor⁺ and CD4⁺ staining, and human neutrophils and monocytes by SSC^{high}CD45⁺CD16⁺ and SSC^{low}CD45⁺CD14⁺CD16⁺, respectively, using a fluorescence-activated cell sorter Aria flow cytometer (BD Biosciences). Purity was >99%.

Dead cells were excluded by gating on 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-negative cells.

In vivo models of immunization and in vitro secondary challenge

LEW.1W heart allografts were transplanted to WT and CLEC-1-deficient recipients as previously described⁹ and were rejected in 7 days.¹⁰ Spleens and grafts were recovered at day 5 after transplantation. Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) (Thermo Fisher, Waltham, MA)-labeled (5 μ M) splenic purified CD4⁺ T cells (1×10^5) from recipients were subjected in vitro to secondary challenge (mixed leukocyte reaction [MLR]) with T-cell-depleted splenocytes (1×10^5) from naïve LEW.1W rats for 3 days.

WT, CLEC-1-deficient, and chimeric rats were immunized subcutaneously in the footpad with keyhole limpet hemocyanin (KLH) protein (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (100 μ g) emulsified (volume-to-volume) in 100 μ L of complete Freund adjuvant (CFA) (Difco, Lawrence, KS). Popliteal lymph nodes (LNs) were harvested 10 days after immunization. CFSE-labeled (5 μ M) total cells or purified CD4⁺ T cells (1×10^5) plus T-cell-depleted splenocytes (1×10^5) from naïve LEW.1A rats were subjected to in vitro secondary challenge with KLH or ovalbumin protein as control (25 μ g/mL) for 3 days.

Cell generation, in vitro stimulation, and MLR

Human monocytes were obtained by elutriation. Human monocyte-derived DCs (moDCs) were generated as previously described from elutriated monocytes cultured for 7 days in complete RPMI 1640 medium (10% endotoxin-free fetal calf serum [Thermo Fisher], 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 1 mM *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid [all reagents from Sigma-Aldrich]), supplemented with IL-4 and granulocyte macrophage-colony-stimulating factor (1000 U/mL; AbCys, Paris, France).¹¹ Cells were then stimulated for 24 hours (1×10^6 /mL) with lipopolysaccharide (LPS) (0.5 μ g/mL) (Sigma-Aldrich), Poly I:C (2 μ g/mL) (Invivogen, San Diego, CA), R848 (2.5 μ g/mL) (Invivogen), recombinant human TGF- β 1 (20 ng/mL) (R&D Systems) alternatively in the presence of 10 μ g/mL of coated anti-hCLEC-1 mAb or IgG1 isotype control. Cells were then subjected to flow cytometry or cultured (12.5×10^3) with 5×10^4 allogeneic human T cells (Pan T Cell Isolation Kit [Miltenyi, Bergisch Glabach, Germany]) for 5 days (MLR). Proliferation was measured by flow cytometry by CFSE profile in CD3⁺CD4⁺ T cells. All cytokines were assessed in supernatants of moDCs or MLR by ELISA (BD Biosciences).

- Human embryonic kidney cells 293T (HEK293T) were obtained from American Type Culture Collection;
- Human aortic ECs (HAECs) or human umbilical vein ECs (HUVECs) were isolated and cultured as previously described¹²; and
- Bone marrow-derived DCs (BMDCs) from naïve, WT, or CLEC-1-deficient LEW.1A rats were obtained as previously described by culturing cells for 8 days in complete RPMI medium, supplemented with rat IL-4 (4 ng/mL) and murine granulocyte macrophage–colony-stimulating factor (1.5 ng/mL).¹³ BMDCs were then stimulated with LPS (1 µg/mL) or zymosan (20 µg/mL) (Invivogen, San Diego, CA) and cocultured (MLR) for 5 days with purified allogeneic CFSE-labeled LEW.1W CD4⁺ T cells. IL-17 and IFN-γ ELISA were from BD Biosciences. Rat CLEC-1 Fc or control human secreted alkaline phosphatase (hSEAP)-Fc fusion protein (supplemental Figure 3) (10 µg/mL) were added in MLR and in rat purified CD4⁺ T cell, stimulated with plate-bound (pb) anti-CD3 (G4.18 clone) (5 µg/mL). Stimulation was performed in the presence of endotoxin inhibitor polymyxine B (10 µg/mL) (Invivogen).

RNA extraction and quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

RNAs from lung transplant biopsies were extracted with FastPrep Lysing Matrix (MP Biomedicals, Santa Ana, CA) and amplified with MessageAmp II aRNA Amplification Kit (Thermo Fisher).

Total RNAs from BMDCs or allografts were prepared using Trizol (Thermo Fisher). Retro-transcription and qRT-PCR was performed using the Viia 7 Real-Time PCR System and SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher) as previously described.¹⁴ Oligonucleotides used in this study are described in Table 1. Human *HPRT*, *IL17A*, *IFNG*, and *TGFB1* probes were from Life Technology. *HPRT* was used as an endogenous control gene for normalization. Relative expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method^{14,15} and expressed in arbitrary units (AUs).

Immunoprecipitation and western blot

Human moDCs were plated on anti-hCLEC-1 (IgG1) or control IgG1 isotype (Invitrogen) mAb coated-plates (10 µg/mL) for 5 or 20 minutes with or without zymosan (20 µg/mL). Human moDCs, HAECs, HUVECs, and HEKs were lysed in Nonidet P-40 1% lysis buffer with protease inhibitors cocktail (Sigma-Aldrich). CLEC-1 immunoprecipitation was performed with 4 µg of anti-hCLEC-1 mAb (D6) followed by incubation with protein G-sepharose beads. Proteins were then treated overnight with PNGase F (Sigma-Aldrich) and dissolved by boiling for 5 minutes in Laemmli sample buffer. Protein concentration was determined using the BC Assays Kit with bovine serum albumin (BSA) as standard (Interchim, San Pedro, CA). Polyvinylidene difluoride membranes were blocked with Tween-20–Tris-buffered saline, 5% BSA, and incubated with anti-phosphotyrosine (4G10), anti-hCLEC-1 (in house), anti-phospho-IκBα (Ser32/36), or anti-IκBα mAbs (0.5 µg/mL) followed by horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. Detection by chemiluminescence was revealed using West Femto chemiluminescence substrate (Thermo Fisher) and monitored by Las 4000 (Fuji).

Immunohistochemistry (IHC)

Human HUVECs, moDCs, monocytes, and neutrophils were fixed in 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA) and alternatively permeabilized with Triton X-100 (0.1%). Cells were stained with anti-hCLEC-1 mAb (D6) or IgG1 isotype control (Invitrogen) (4 µg/mL) in phosphate-buffered saline 1% fetal calf serum, 1% BSA, and then with secondary Alexa-488 anti-mouse IgG1 antibodies for 1 hour. After 10 minutes in phosphate-buffered saline 1% DAPI, slides were mounted using Prolong Antifade Reagent (Invitrogen) and observed by confocal fluorescence microscopy (Nikon A1-RSi). Images were obtained (×60 Plan Apo N.A.: 1.4, zoom 2) with sequential mode, and analyzed by using ImageJ software. Quantitation of CLEC-1 was performed by Volocity software (PerkinElmer, Waltham, MA).

Table 1. Oligonucleotides (5' to 3') used for rat qRT-PCR

Gene	Oligonucleotides (5' to 3')
<i>r Hpvt 5'</i>	CCTTGGTCAAGCAGTACAGCC
<i>r Hpvt 3'</i>	CTGTCTCACAAGGGAAGTGACAA
<i>r Il6 5'</i>	ACAGCGATGATGCACTGTCA
<i>r Il6 3'</i>	GGAAGTCCAGAAGACCAGAGC
<i>r Il12p35 5'</i>	TGATGATGACCCCTGTGCCCTT
<i>r Il12p35 3'</i>	GCATGGAGCAGGATACAGAGC
<i>r Il12p40 5'</i>	ATCATCAAACCGGACCCACC
<i>r Il12p40 3'</i>	CAGGAGTCAGGGTACTCCCA
<i>r Il23p19 5'</i>	GGACTCGGACATCTTCACAGG
<i>r Il23p19 3'</i>	GGAACGGAGAAGAGAAGCGCT
<i>r Il10 5'</i>	CCTCTGGATACAGCTGCGAC
<i>r Il10 3'</i>	GTAGATGCCGGGTGGTTCAA
<i>r Tgfb1 5'</i>	CTCAACACCTGCACAGCTCC
<i>r Tgfb1 3'</i>	ACGATCATGTTGGACAAGTGTCT
<i>r Il17a 5'</i>	TGCTGTTGCTGCTACTGAACC
<i>r Il17a 3'</i>	AACTTCCCCTCAGCGTTGAC
<i>r Ifng 5'</i>	AGTGTGCATCGAATCGCACCTG
<i>r Ifng 3'</i>	TTCTGGTGACAGCTGGTGAAT

Hpvt, hypoxanthine phosphoribosyltransferase; r, rat.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (La Jolla, CA) with 2-tailed unpaired nonparametric Student *t* test (Mann-Whitney). Results were considered significant if *P* values were < .05.

Results

Human myeloid DCs express CLEC-1 at the cell surface

So far, only limited information has been published on CLEC-1 expression in humans.^{4,5,8} qRT-PCR analysis in pooled organs demonstrates a strong expression of *CLEC1A* transcripts in placenta and lung, and a more moderate expression in the lymphoid organs including spleen, LNs, thymus, and tonsils (supplemental Figure 4i). In human cell subtypes, abundant *CLEC1A* transcripts were found in neutrophils, monocytes, moDCs, and HAECs (supplemental Figure 4ii). No transcripts were detected in T and B cells. We demonstrate by CLEC-1 immunoprecipitation followed by western blot, a high level of CLEC-1 protein in moDCs and ECs (Figure 1A). By generating a mAb directed against the extracellular domain of anti-human CLEC-1, we observed a low ectopic expression of CLEC-1 at the cell-surface of transfected HEKs (supplemental Figure 5A). These data are in accordance with previous studies^{5,6,16} and suggest that CLEC-1 requires other adaptor chains, other PRRs, or sufficient glycosylation for efficient expression, transport, and cell-surface stability as described for other CLR.^{17,18} No improvement was observed by cotransfecting cells with plasmids encoding the adaptor proteins DAP12 and FcRγ (data not shown). Cell-surface CLEC-1 expression was confirmed by IHC in transfected cells with anti-hCLEC-1 mAb (D6 clone) (supplemental Figure 5B).

With this generated mAb, we investigated CLEC-1 protein expression in human cell subtypes. Interestingly, we observed in blood

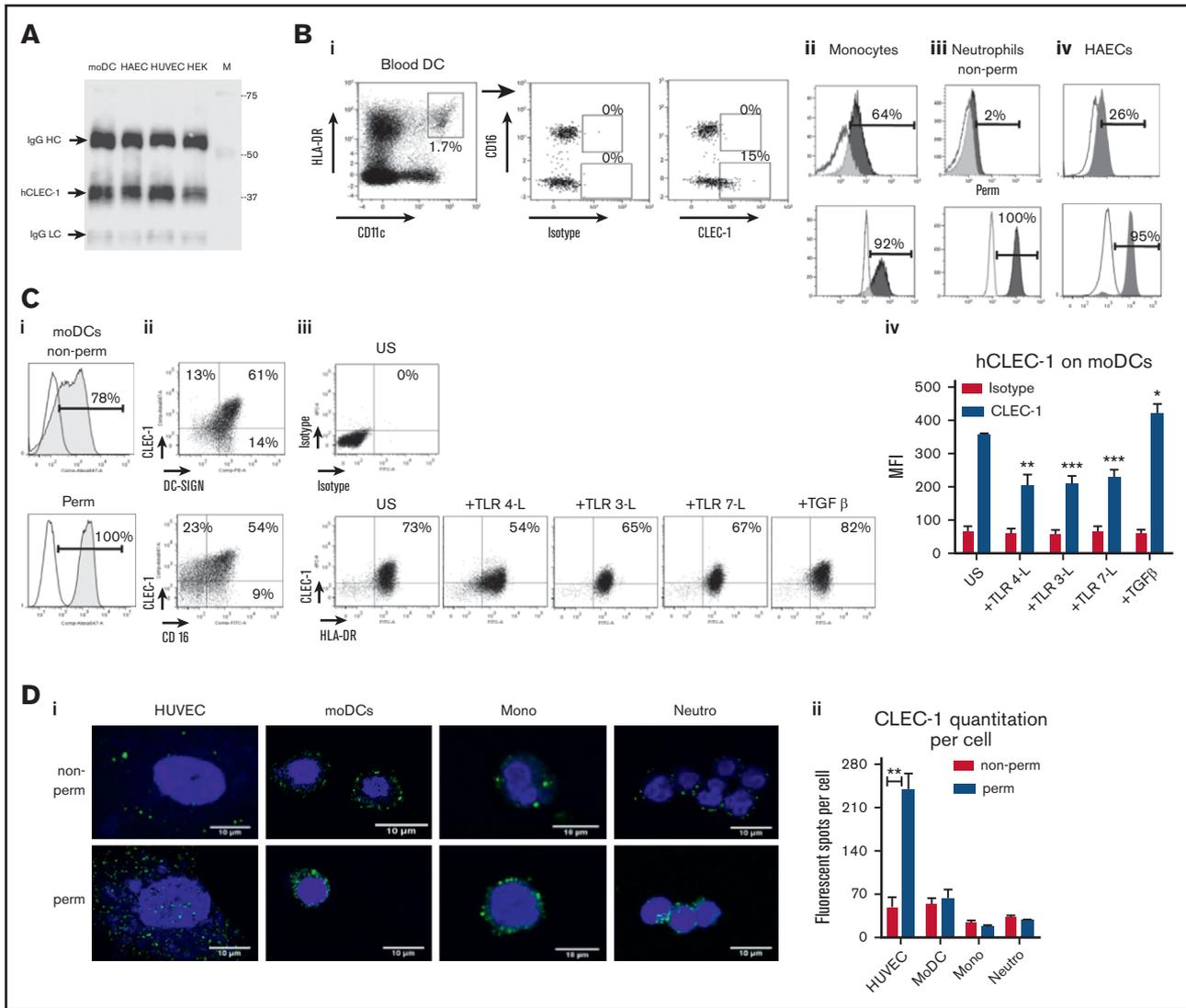


Figure 1. Human DCs express cell-surface CLEC-1. (A) Western blot analysis of CLEC-1 expression in human moDCs, HAECs, HUVECs, and HEKs. Cell extracts were immunoprecipitated with anti-human CLEC-1 mAb (D6 clone) and then analyzed by western blot with a second in-house anti-human CLEC-1 mAb (IgG1). Arrows indicate human CLEC-1 and IgG HC and LC at the expected size of 32, 50, and 25 kDa, respectively. M line represents molecular-weight size markers. (B) Representative dot plots and histograms of IgG1 isotype or CLEC-1 (IgG1) staining in non-permeabilized (non-perm) and permeabilized (perm) conditions, evaluated by flow cytometry for human blood: (i) CD11c⁺ and CD16⁻ subpopulation of CD45⁺CD14⁻CD11c⁺HLA-DR^{high} DCs; (ii) CD45⁺CD14⁺CD16⁺ monocytes; (iii) SSC^{high}CD16⁺ neutrophils; and (iv) HAECs. Histograms represent the overlay image of CLEC-1 staining (gray filled histogram) matching the isotype control IgG1 staining (open histogram). (C) Representative dot plots or histograms of IgG1 isotype or CLEC-1 (IgG1) staining vs DC-SIGN or CD16 staining for human moDCs in non-perm or perm conditions and evaluated by flow cytometry (i-ii). Histograms represent the overlay image of CLEC-1 staining (gray filled histogram) matching the isotype control IgG1 staining (open histogram). (iii) Cell-surface expression of CLEC-1 vs HLA-DR on unstimulated (US), TLR 4-L (LPS), TLR 3-L (Poly I:C), TLR 7-L (R848), and TGF-β-stimulated moDCs. (iv) Histogram represents MFI ± standard error of the mean (SEM) of CLEC-1 staining of 6 independent experiments. Statistical analysis of CLEC-1 MFI staining was performed between US and each stimuli. Panel Di shows representative confocal microscopy images, and (ii) quantitation of CLEC-1 protein in non-perm and perm conditions for human HUVECs, moDCs, CD16⁺ monocytes and neutrophils. Panels exhibiting DAPI (blue) and CLEC-1 (green) staining revealed by anti-human CLEC-1 mAb (D6 clone) followed by secondary anti-mouse Alexa-488 antibody. Original magnification ×600. Images are representative of 4 independent experiments. CLEC-1 protein quantitation was performed by velocity software and expressed as histogram of mean ± SEM of numbers of fluorescent spots per cell (n ≥ 7). *P < .05; **P < .01; ***P < .001. IgG HC, IgG heavy chain; IgG LC, IgG light chain; MFI, mean fluorescence intensity; mono, monocytes; neutro, neutrophils.

that cell-surface CLEC-1 expression is restricted to the CD16⁻ subpopulation of myeloid DCs and to CD14⁺CD16⁺ monocytes (Figure 1Bi-ii). Low CLEC-1 expression was observed at the cell-surface of neutrophils and HAECs where expression is mostly intracellular, as previously reported^{6,8} (Figure 1Biii-iv). No expression of CLEC-1 was observed at the cell-surface or intracellularly in blood BDCA3⁺ myeloid or CD123⁺ plasmacytoid DCs (supplemental

Figure 6). Almost all cultured moDCs express cell-surface CLEC-1, which is largely coexpressed with the other CLR DC-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN); however, in contrast to blood, CLEC-1 does not appear to be restricted to the CD16⁻ subpopulation (Figure 1Ci-ii). Importantly, as we previously described in rats,⁴ CLEC-1 expression is decreased on human moDCs by inflammatory stimuli such as toll-like receptor (TLR) ligands, and is

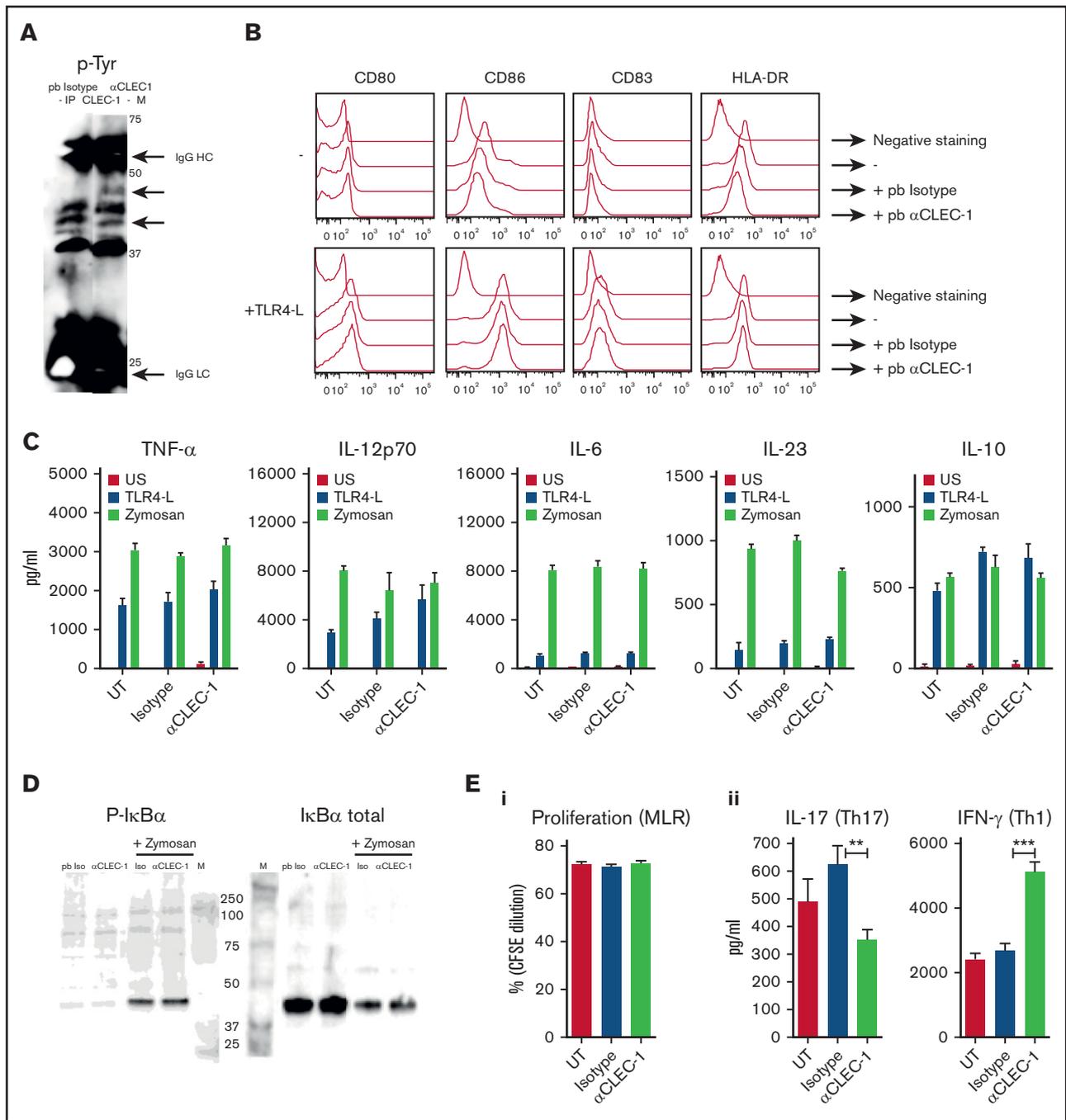


Figure 2. CLEC-1 triggering on human moDCs prevents downstream Th17 activation. (A) Human moDCs were stimulated with pb anti-CLEC-1 or IgG1 isotype control mAb for 5 minutes. CLEC-1 and binding partners were immunoprecipitated in low-stringent conditions (D6 clone) and were revealed by western blot using anti-phosphotyrosine mAb (4G10). Representative image of western blot with arrows indicating bands with changes in phosphorylation intensity between isotype control and anti-hCLEC-1 mAb stimulation, and IgG HC and LC chains of immunoprecipitating antibody (at the expected size of 50 and 25 kDa, respectively). M line represents molecular-weight size markers. Data are representative of 3 independent experiments. (B) Human moDCs were incubated with or without (–) pb anti-hCLEC-1 or IgG1 isotype control mAbs, and were alternatively stimulated simultaneously with TLR 4-L (LPS) or zymosan for 24 hours, and CD80, CD86, CD83, and HLA-DR were evaluated by flow cytometry (overlays are representative of 8 independent experiments). (C) Tumor necrosis factor- α , IL-12p70, IL-6, IL-23, and IL-10 were assessed by ELISA in supernatants (histograms represent mean \pm SEM of 8 independent experiments). (D) Human moDCs were stimulated with pb anti-hCLEC-1 or IgG1 Iso control mAbs for 20 minutes and with or without zymosan. Representative images of western blot revealing phosphorylation of I κ B α (PSer32/36) or the degradation of total I κ B α at the expected size of 40 and 39 kDa, respectively. Data are representative of 3 independent experiments. M line represents molecular-weight size markers. (E) Following 24 hours of CLEC-1 triggering, human moDCs were extensively washed and subjected to MLR with allogeneic T cells for 5 days. (i) T-cell proliferation was assessed (CFSE dilution) by flow cytometry in allogeneic T cells, and (ii) IL-17 and IFN- γ production was evaluated by ELISA in supernatants. Data were expressed in histograms as mean \pm SEM of 8 independent experiments. ** $P < .01$; *** $P < .001$. IgG HC, IgG heavy chain; IgG LC, IgG light chain; Iso, isotype; UT, untreated.

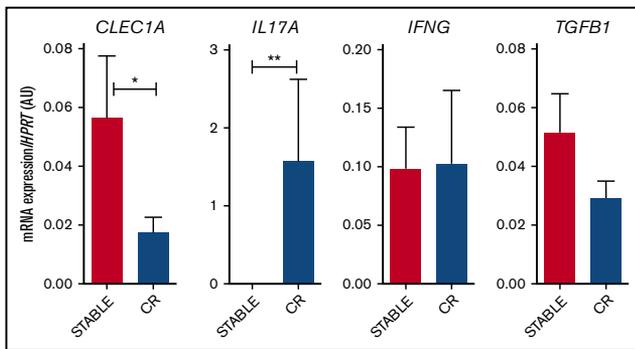


Figure 3. Decreased *CLEC1A* expression in lung transplants is predictive of CR. Lung transplants from stable patients or from patients prior to the development of CR were subjected to qRT-PCR for *HPRT*, *CLEC1A*, *IL17A*, *IFNG*, and *TGFB1*. Results were expressed in histograms as mean \pm SEM of 7 samples in each group and were expressed in AU of specific cytokine/*HPRT* ratio. * $P < .05$; ** $P < .01$. mRNA, messenger RNA.

upregulated by TGF- β (Figure 1Ciii-iv). By IHC, we confirmed that CLEC-1 expression is mostly intracellular for ECs, and at the cell-surface for moDCs and monocytes (Figure 1Di-ii). These results demonstrate that CLEC-1, as for the CLR DC-SIGN,¹⁹ is restricted to a particular cell subtype of DCs in blood while being largely expressed by moDCs, suggesting that CLEC-1 is enhanced in particular conditions.

In vitro CLEC-1 triggering on human moDCs suppresses downstream allogeneic Th17 activation

Because CLEC-1 natural ligands have not yet been identified, we used anti-human CLEC-1 mAb to mimic the ligand and crosslink CLEC-1 at the cell-surface of moDCs. By CLEC-1 immunoprecipitation in low stringent conditions, we observed no tyrosine phosphorylation at the expected size of CLEC-1 (32 kDa) following CLEC-1 ligation, suggesting that tyrosine motif in the cytoplasmic tail is not phosphorylated (Figure 2A). Nevertheless, we observed several changes in the tyrosine phosphorylation pattern with enhanced or decreased phosphorylation of several bands around 40 to 50 kDa in size, strongly suggesting that CLEC-1 is a functional receptor that signals via binding partners that remain to be identified.

We next investigated whether CLEC-1 triggering potentiates or suppresses PRR-induced moDCs maturation, NF- κ B pathway activation, or downstream T-cell polarization as previously described for other activating or inhibitory CLRs.³ We observed that CLEC-1 triggering on moDCs does not induce by itself nor does it modulate the expression of the activation markers CD80, CD86, CD83, and HLA-DR, or the production of tumor necrosis factor- α , IL-12p70, IL-6, IL-23, and IL-10 induced by TLR 4 ligand (TLR 4-L), zymosan (agonist of both DECTIN-1 and TLR 2) (Figure 2B-C), TLR 3, and TLR 7 ligands (data not shown). Moreover, CLEC-1 triggering does not induce by itself nor does it modulate the zymosan-induced activation of the SYK-dependent canonical NF- κ B pathway, evaluated by the phosphorylation of the NF- κ B inhibitor I κ B α (Ser32/36) and by its degradation (Figure 2D). Nevertheless, because CLEC-1 activation was achieved by antibody crosslinking, it will be important to determine whether true ligands, once identified, elicit similar responses. These results suggest that CLEC-1 may engage an alternative pathway of NF- κ B activation that requires further investigation.

Interestingly, we observed that CLEC-1 triggering on moDCs alone (Figure 2Ei-ii) or in combination with TLR L or zymosan (data not shown), although not modulating the subsequent proliferation of allogeneic T cells, reduced Th17 activation and skewed the response toward a Th1 polarization.

These data demonstrate that CLEC-1 triggering on human moDCs inhibits downstream Th17 response.

Downregulation of *CLEC1A* expression in human lung transplants is predictive of CR

Given the strong expression of *CLEC1A* in lung, we investigated its modulation in lung biopsies from stable patients or from patients prior to the diagnostic of CR. At that time, biopsies do not exhibit histopathology signs of rejection (supplemental Figure 7). Interestingly, we observed a lower expression of *CLEC1A* transcripts in biopsies from patients prior to CR, and this was associated with a higher level of *IL17A* transcripts (Figure 3). No difference was observed for *IFNG* or *TGFB1* expression. These data suggest that the strong expression of CLEC-1 in lung, as a CLR potentially involves in the first-line of defense against pathogens, may play also a crucial role in adaptive immune response to locally dampen Th17 responses.

Disruption of CLEC-1 signaling in rat BMDCs enhances in vitro T-cell responses

To gain insight into the function of CLEC-1, we generated CLEC-1-deficient rats that are viable, healthy, and born from heterozygote breeding with the expected Mendelian frequency. At steady-state, CLEC-1-deficient rats exhibited regular myeloid and lymphoid immune cell compartments in blood and peripheral lymphoid organs (data not shown).

We previously showed that rat BMDCs express CLEC-1.⁴ Therefore, we compared these cells from WT and CLEC-1-deficient rats for their phenotype and function. We observed no difference in their ability to mature in response to TLR4 L or zymosan, according to the maturation markers CD80, CD86, and Class-I and -II major histocompatibility complex (Figure 4A). However, we found that CLEC-1-deficient BMDCs expressed a higher level of *I12p40* subunit than WT BMDCs in US condition, and following LPS and zymosan activation (Figure 4B). An increase in *I12p35* was also observed following zymosan stimulation. No difference was observed for *I123p19*, *I16*, *I110*, and *Tgfb1* expression. Furthermore, CLEC-1-deficient BMDCs induced an enhanced proliferation of allogeneic CD4⁺ T cells in MLR that was associated with an increased number of IL-17⁺ CD4⁺ T cells (Figure 4Ci-ii, respectively).

To confirm these data, we generated rat CLEC-1 Fc fusion protein (supplemental Figure 3) that should block CLEC-1 interaction on BMDCs with its putative ligand(s), and thus mimic CLEC-1 deficiency. Similarly, we observed in the presence of CLEC-1 Fc fusion protein in MLR, a more prominent proliferation of allogeneic T cells and more IL-17 production (Figure 5Ai-ii, respectively). As control, no direct effect of CLEC-1 Fc was observed on proliferation or on IL-17⁺ cells number, and IL-17 production of anti-CD3 polyclonally activated CD4⁺ T cells (Figure 5Bi-ii, respectively). This demonstrates that the increase of Th17 activation in MLR was specific to CLEC-1 signaling disruption in BMDCs, and not due to ligation of CLEC-1 Fc and possible agonist effect on a putative ligand on T cells.

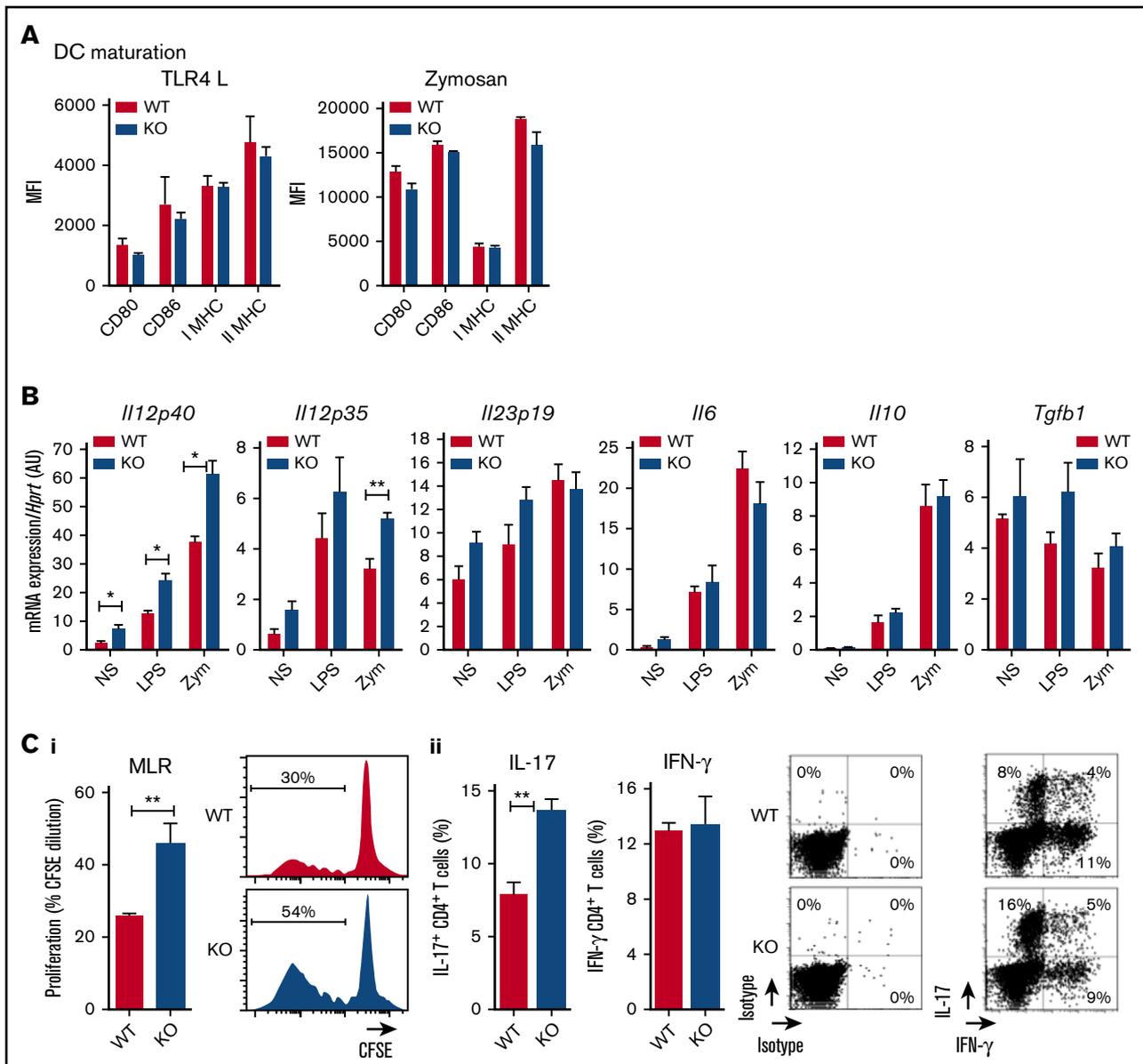


Figure 4. Rat CLEC-1-deficient BMDCs enhance Th17-cell activation. (A) BMDCs from WT and CLEC-1-deficient rats were stimulated with TLR 4-L or zymosan for 24 hours, and CD80, CD86, and Class I and II major histocompatibility complex (MHC) were assessed by flow cytometry. Data were expressed in histograms as mean \pm SEM of 6 independent experiments. (B) BMDCs were stimulated with TLR4-L or zymosan for 8 hours, and *Il12p40*, *Il12p35*, *Il23p19*, *Il6*, *Il10*, and *Tgfb1* were assessed by qRT-PCR. Results were expressed in histograms as mean \pm SEM of 6 independent experiments and were expressed in AU of specific cytokine/*Hprt* ratio. (C) BMDCs were incubated for 4 days in MLR with allogeneic purified CD4⁺ T cells. (i) Histogram and representative staining of proliferation (CFSE dilution) assessed in CD4⁺ T cells by flow cytometry, and (ii) histogram and representative dot plots of percentage of IL-17⁺ and IFN- γ ⁺ cells among gated CD4⁺ T cells assessed by flow cytometry. Data were expressed in histograms as mean \pm SEM of 6 independent experiments. **P* < .05; ***P* < .01. KO, knockout; MFI, mean fluorescence intensity; mRNA, messenger RNA; NS, nonstimulated.

Taken collectively, these data demonstrate in vitro that the absence of CLEC-1 signaling in rat BMDCs enhanced their *Il12p40* subunit expression and their ability to induce allogeneic Th17 cell activation.

CLEC-1 deficiency enhances in vivo DC-mediated Th1 and Th17 responses

We previously described in rat that conventional DCs (cDCs) from secondary lymphoid organs express CLEC-1.⁴ Therefore, we

investigated the potential function of CLEC-1 in DC-mediated antigen-presentation and Th responses following in vivo immunization.

Following subcutaneous injection of KLH and CFA, we observed after in vitro secondary challenge of total draining LNs or purified CD4⁺ T cells from CLEC-1-deficient rats, an increased proliferation of KLH-specific CD4⁺ T cells associated with an increased number of IL-17⁺, IL-17⁺ IFN- γ ⁺, and IFN- γ ⁺ CD4⁺ T cells (Figure 6Ai-ii, respectively). Importantly, similar results were obtained in chimeric rats (WT rats fully reconstituted with BM from CLEC-1-deficient rats), suggesting that this enhanced in vivo

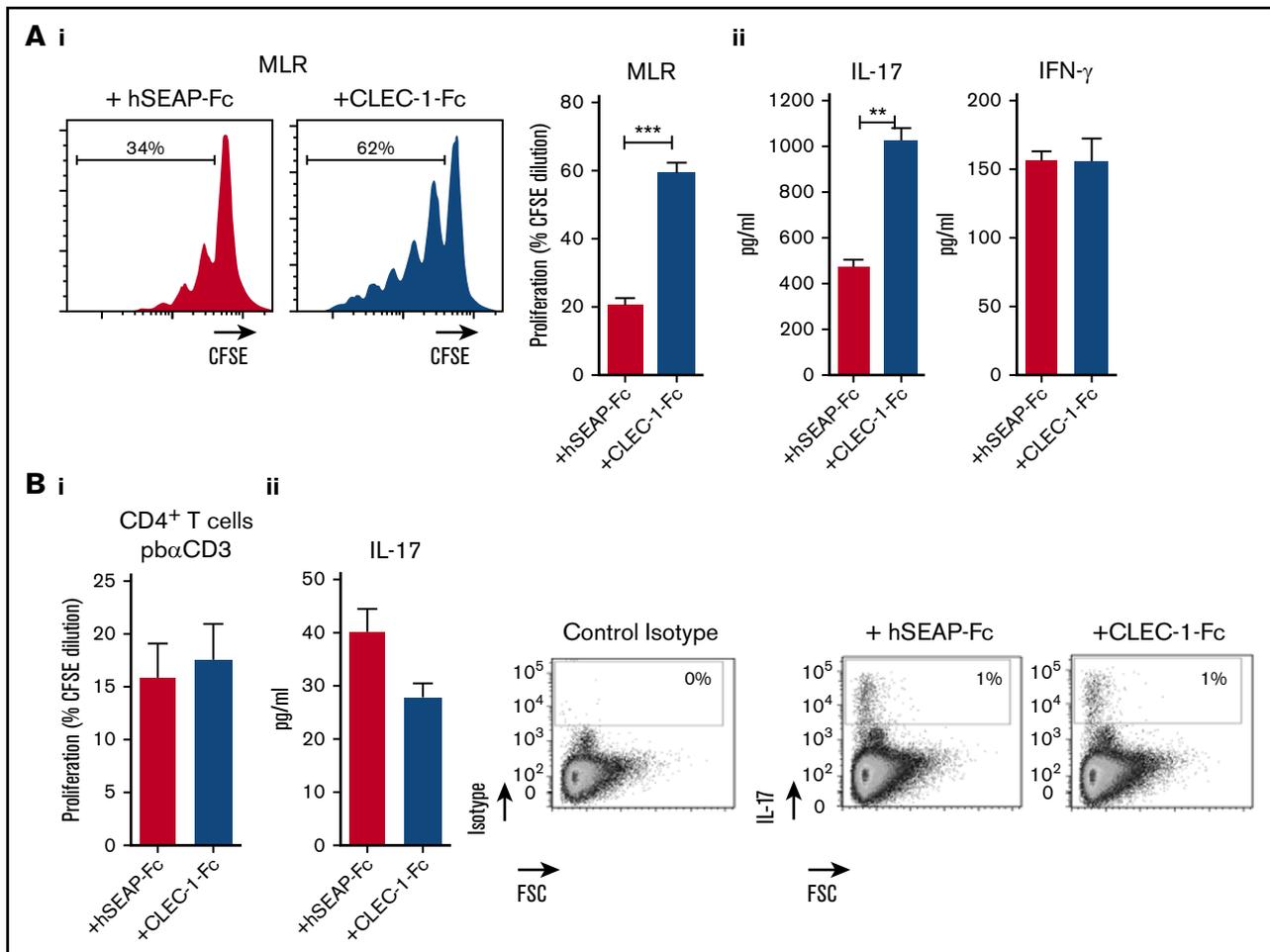


Figure 5. Blocking CLEC-1 Fc fusion protein enhances rat BMDC-mediated Th17-cell activation. (A) BMDCs from naïve rats were incubated for 4 days in MLR with allogeneic purified CD4⁺ T cells, together with CLEC-1 Fc or irrelevant hSEAP-Fc fusion proteins (produced and purified under the same conditions) (10 μg/mL). (i) Histogram of proliferation (CFSE dilution) of CD4⁺ T cells assessed by flow cytometry, and (ii) IL-17 and IFN-γ cytokine production assessed in supernatants of MLR by ELISA. Data were expressed in histograms as mean ± SEM of 4 independent experiments. (B) Purified CD4⁺ T cells from naïve rats were stimulated with pb anti-CD3 (5 μg/mL) in combination with CLEC-1-Fc or irrelevant hSEAP-Fc fusion proteins (10 μg/mL) for 4 days. (i) Proliferation (CFSE dilution) was assessed by flow cytometry, and (ii) IL-17 cytokine production was assessed in supernatants by ELISA and in CD4⁺ T cells by flow cytometry as FSC vs isotype or IL-17 staining. Data were expressed as histograms as mean ± SEM of 4 independent experiments. ***P* < .01; ****P* < .001. FSC, forward scatter.

priming was due to the absence of CLEC-1 in myeloid cell compartment and not to the one in ECs (Figure 6Aiii).

Similarly, following immunization with cardiac allografts, we observed after *in vitro* secondary challenge of splenic purified T cells from CLEC-1-deficient rats, an increased proliferation of allogeneic T cells (Figure 6Bi). In addition, although allografts were rejected with a similar kinetic at day 7 after transplantation (data not shown), we observed an increased expression of *Il17a* transcripts in allografts from CLEC-1-deficient recipients, suggesting more Th17 cell activation (Figure 6Bii).

These data demonstrate that the *in vivo* deficiency of CLEC-1 signaling in cDCs exacerbates priming, and downstream Th17 and Th1 responses in both innate and adaptive immunity.

Discussion

In this study, we demonstrate that CLEC-1 is a functional cell-surface inhibitory receptor on human DCs that restrains downstream Th17

activation. Furthermore, the use of CLEC-1-deficient animals brings to light an *in vivo* function for CLEC-1 in the prevention of excessive DC-mediated CD4⁺ T-cell priming, and Th17 and Th1 polarization. Interestingly, we found in human blood, a cell-surface CLEC-1 expression restricted to myeloid CD16⁻ DCs and to CD14⁺CD16⁺ monocytes. Both cell subtypes are known to exhibit strong pro-inflammatory properties and to be potent inducers of Th17 cell expansion.²⁰⁻²³ Moreover, cell-surface CLEC-1 expression was observed on human moDCs, and as in rat,⁴ is decreased by inflammatory stimuli and is upregulated by TGF-β. In contrast, CLEC-1 appears to be mostly expressed intracellularly in ECs and neutrophils. Therefore, as for other CLR receptors such as LOX-1 or DC-SIGN, pattern, localization, and regulation of CLEC-1 expression may depend on cell subtypes and microenvironment.²⁴⁻²⁶ Cell-surface CLEC-1 may be enhanced in particular conditions such as an environment rich in TGF-β to locally impede excessive inflammatory response. Indeed, we originally identified CLEC-1 as upregulated in a TGF-β-dependent model of rat allograft tolerance, and demonstrated that regulatory

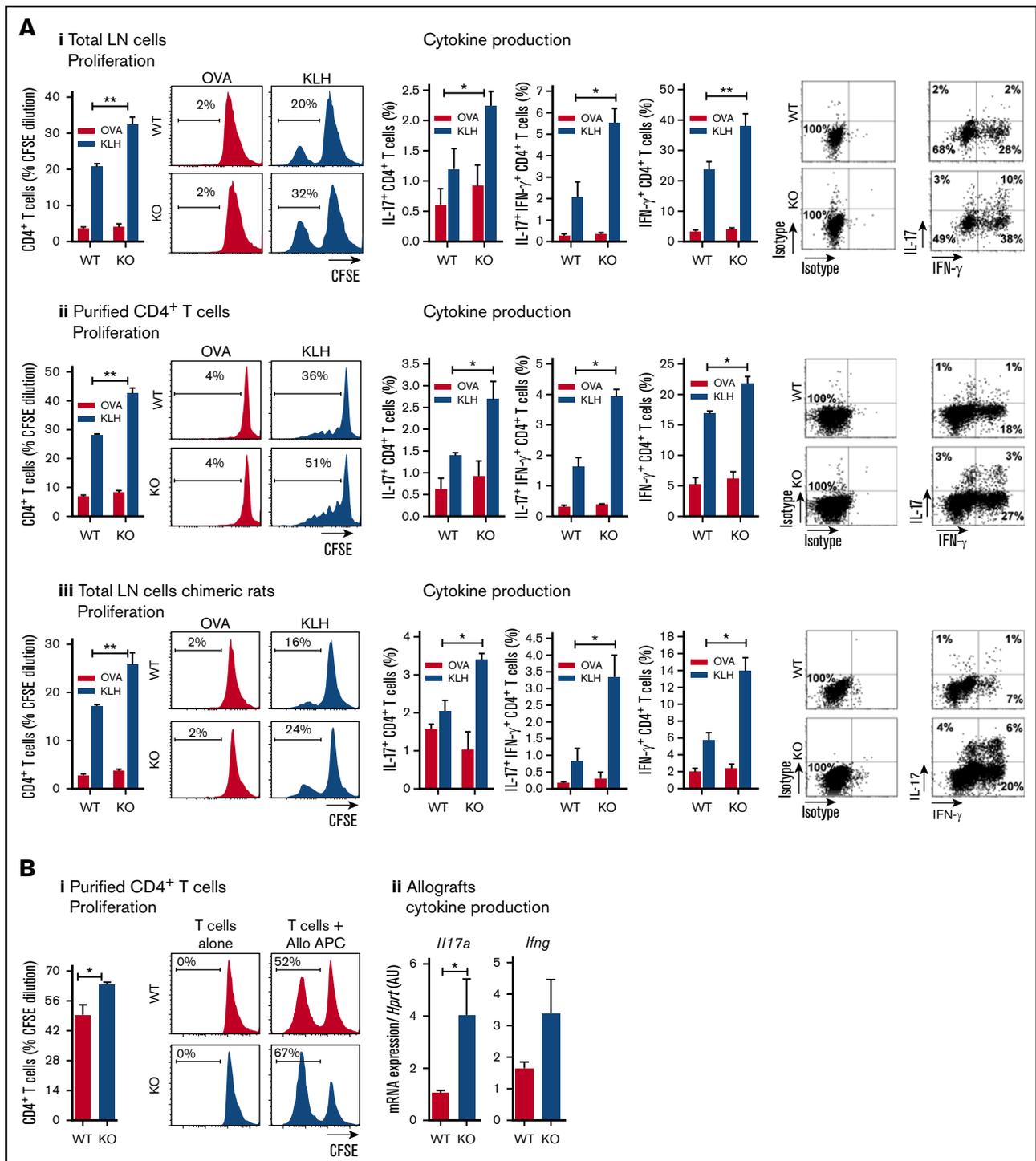


Figure 6. CLEC-1-deficient rats exhibit an exacerbation of in vivo DC-mediated CD4⁺ Th1/Th17 responses. (A) WT, CLEC-1-deficient rats (i-ii) and chimeric rats reconstituted with BM from WT or CLEC-1-deficient rats (iii) were immunized subcutaneously in the footpad with CFA plus KLH protein (100 μ g/mL). At day 10 after immunization, popliteal LNs were harvested and total LN cells or purified CD4⁺ T cells were re-stimulated in vitro with KLH or control ovalbumin (25 μ g/mL) for 3 days. Histograms and representative plots of proliferation (CFSE dilution) and percentage of IL-17⁺, IL-17⁺ IFN- γ ⁺, and IFN- γ ⁺ cells in gated CD4⁺ T cells assessed by flow cytometry. Data were expressed as histograms as mean \pm SEM of 4 independent experiments. Staining of isotypes was indicated as control. (B) WT and CLEC-1-deficient rats were transplanted with cardiac allografts. (i) At day 5 after transplantation, purified CD4⁺ T cells from spleen were re-stimulated in vitro with donor T-cell-depleted splenocytes (MLR) for 3 days. Histograms of proliferation (CFSE dilution) in gated CD4⁺ T cells assessed by flow cytometry and expressed as mean \pm SEM of 4 independent experiments. (ii) *I17a* and *Ifng* were assessed by qRT-PCR in cardiac allografts harvested at day 5 after transplantation. Results were expressed in histograms as mean \pm SEM of 4 independent experiments and were expressed in AU of specific cytokine/*Hprt* ratio. * P < .05; ** P < .01. mRNA, messenger RNA.

CD4⁺CD25⁺ T cells enhance CLEC-1 expression and are necessary for DC-mediated Th17 inhibition.⁴ Importantly, we found a decreased expression of *CLEC1A* in human lung as predictive of the Th17-associated development of CR.²⁷ Therefore, CLEC-1 may represent a new therapeutic target in a clinical setting to limit Th17 activation and notably lung tissue injury. This profile of expression in DCs with a decrease following inflammatory stimulation represents a classic response observed for other inhibitory receptors such as myeloid C-type lectin-like receptor²⁸ or DC immunoreceptor,²⁹ which have also been shown to suppress in vivo T-cell responses and inflammation.^{30,31} However, in contrast to these inhibitory CLRs,^{28,29} CLEC-1 does not hamper total DC maturation or pro-inflammatory cytokine production, and we only observed a decrease of *I12p40* subunit expression. Interestingly, the activating receptor DECTIN-1, has in contrast been shown to enhance *I12p40* subunit expression in DCs to promote bioactive IL-23 and IL-12p70 production, and Th17 and Th1 polarization.³²⁻³⁴ DECTIN-1 ligation on DCs was shown to trigger the SYK-dependent activation of both the canonical and noncanonical NF-κB pathways, with the latter repressing the *I12p40* expression. However, according to the ligand, DECTIN-1 can also signal through a SYK-independent Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase (RAF-1) pathway to prevent *I12p40* repression.³³ For example, in response to Curdlan and *Candida albicans* challenge, DECTIN-1 leads in mice to both Th1 and Th17 polarization,³³ whereas in response to *Aspergillus fumigatus*, it potentiates Th17 differentiation by inhibiting Th1 polarization.³⁵ We observed in DCs that CLEC-1 signaling alone or in combination with TLR L or zymosan suppress particularly the subsequent Th17 activation in vitro, but both Th1 and Th17 responses following immunization with CFA in vivo. Because CFA is known to trigger numerous PRRs such as CLRs,³⁶ this suggests that CLEC-1 may differently suppress the Th1 or Th17 responses according to the ligands and PRR coengagement. Alternatively, CLEC-1 in DCs may also shape the Th17/Th1 balance by mechanisms others than the only expression of polarizing cytokines. For example, DECTIN-1 signaling in DCs has been shown to influence T-cell polarization fate by modulating also the expression of the costimulatory molecules OX40 ligand.³⁷

We found that CLEC-1 ligation does not induce by itself nor does it modulate the zymosan-induced activation of the SYK-dependent canonical NF-κB pathway. Nevertheless, we observed changes in the phosphorylation pattern of CLEC-1-binding partners. Therefore, CLEC-1 by itself or through partners could suppress *I12p40* expression by acting via the noncanonical NF-κB pathway. Alternatively, CLEC-1 could antagonize the SYK-independent RAF-1 pathway. Interestingly, CLEC-1 contains in its cytoplasmic tail a tri-acidic motif [DDD],³ which has been shown for other CLRs to promote RAF-1 signaling and to modulate PRRs pathways.³⁸⁻⁴⁰ However, if this tri-acidic motif is functional for CLEC-1 is currently unknown.

We have not been able to detect the cells expressing the endogenous ligands with a CLEC-1 Fc fusion protein. Nevertheless, our in vitro data

suggest that CLEC-1 ligands may be expressed by hematopoietic cells themselves, or released “naturally” or during cell damage. For examples, DC immunoreceptor-2 and its endogenous ligand have been described to be both expressed at the cell-surface of cDCs in mice.²² DECTIN-2 was shown to recognize as “danger sensor” molecules released into DC culture and a putative ligand on regulatory T cells to suppress immune responses.^{41,42} An endogenous ligand for DECTIN-1 has also been reported on T cells that, in contrast to CLEC-1, acts as a costimulatory molecule enhancing T-cell proliferation.⁴³ Therefore, the identification of CLEC-1 ligand(s) is urgently needed to better decipher cell signaling and function.

In conclusion, these findings establish in both human and rodent, the relevance of CLEC-1 in DCs in the tight control of downstream Th17 responses. CLEC-1 as an inhibitory cell-surface receptor may represent a therapeutic tool to manipulate the degree and quality of T-cell responses, and a new treatment paradigm in transplantation, autoimmunity, cancer vaccination, and infectious diseases.

Acknowledgments

The authors thank the COhort in Lung Transplantation consortium (Coordinator: Antoine Magnan, Centre Hospitalier Universitaire of Nantes) for lung biopsies from lung-transplant recipients, Jerome Martin (INSERM UMR 1064, Nantes) for human neutrophil complementary DNAs, and Philippe Hulin (SFR, Nantes) for confocal microscopy.

This work was supported by the “CENTAURE” foundation, “Agence de la Biomédecine 2015-2016” and realized in the context of the Institut Hospitalo-Universitaire-Cesti project, and the LabEx Immunotherapy Graft-Oncology program, which received French government financial support managed by the National Research Agency via the investment of the future program (ANR-10-IBHU-005 and ANR-11-LABX-0016-01).

Authorship

Contribution: M.D.L.R., A.P., V.H., L.L.T., S.R., C. Braudeau, and L.D. performed experiments; M.D.L.R., A.P., V.H., and E.C. analyzed results and made the figures; A. Moreau, C.L., C. Brosseau, P.-J.R., A. Magnan, F.H., R.J., M.-C.C., I.A., and E.C. designed the research and critically revised the article; and E.C. designed the research and wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

ORCID profiles: E.C., 0000-0001-6167-682X.

Correspondence: Elise Chiffolleau, INSERM, UMR 1064, Centre Hospitalier Universitaire, University of Nantes, Hotel Dieu, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes, France; e-mail: elise.chiffolleau@univ-nantes.fr.

References

1. Geijtenbeek TB, Gringhuis SI. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(7):465-479.
2. Dambuzza IM, Brown GD. C-type lectins in immunity: recent developments. *Curr Opin Immunol*. 2015;32:21-27.
3. Plato A, Willment JA, Brown GD. C-type lectin-like receptors of the dectin-1 cluster: ligands and signaling pathways. *Int Rev Immunol*. 2013;32(2): 134-156.

4. Thebault P, Lhermite N, Tilly G, et al. The C-type lectin-like receptor CLEC-1, expressed by myeloid cells and endothelial cells, is up-regulated by immunoregulatory mediators and moderates T cell activation. *J Immunol.* 2009;183(5):3099-3108.
5. Colonna M, Samaridis J, Angman L. Molecular characterization of two novel C-type lectin-like receptors, one of which is selectively expressed in human dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2000;30(2):697-704.
6. Sobanov Y, Bernreiter A, Derdak S, et al. A novel cluster of lectin-like receptor genes expressed in monocytic, dendritic and endothelial cells maps close to the NK receptor genes in the human NK gene complex. *Eur J Immunol.* 2001;31(12):3493-3503.
7. Flornes LM, Nylenna Ø, Saether PC, Daws MR, Dissen E, Fossum S. The complete inventory of receptors encoded by the rat natural killer cell gene complex. *Immunogenetics.* 2010;62(8):521-530.
8. Sattler S, Reiche D, Sturtzel C, et al. The human C-type lectin-like receptor CLEC-1 is upregulated by TGF- β and primarily localized in the endoplasmic membrane compartment. *Scand J Immunol.* 2012;75(3):282-292.
9. Ono K, Lindsey ES. Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1969;57(2):225-229.
10. Chiffolleau E, Bériou G, Dutartre P, Usal C, Souillou JP, Cuturi MC. Induction of donor-specific allograft tolerance by short-term treatment with LF15-0195 after transplantation. Evidence for a direct effect on T-cell differentiation. *Am J Transplant.* 2002;2(8):745-757.
11. Spisek R, Bretaudeau L, Barbieux I, Meflah K, Gregoire M. Standardized generation of fully mature p70 IL-12 secreting monocyte-derived dendritic cells for clinical use. *Cancer Immunol Immunother.* 2001;50(8):417-427.
12. Le Bas-Bernardet S, Hourmant M, Coupel S, Bignon JD, Souillou JP, Charreau B. Non-HLA-type endothelial cell reactive alloantibodies in pre-transplant sera of kidney recipients trigger apoptosis. *Am J Transplant.* 2003;3(2):167-177.
13. Pêche H, Heslan M, Usal C, Amigorena S, Cuturi MC. Presentation of donor major histocompatibility complex antigens by bone marrow dendritic cell-derived exosomes modulates allograft rejection. *Transplantation.* 2003;76(10):1503-1510.
14. Louvet C, Heslan JM, Merieau E, Souillou JP, Cuturi MC, Chiffolleau E. Induction of Fractalkine and CX3CR1 mediated by host CD8⁺ T cells in allograft tolerance induced by donor specific blood transfusion. *Transplantation.* 2004;78(9):1259-1266.
15. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-408.
16. Kataoka H, Kume N, Miyamoto S, et al. Biosynthesis and post-translational processing of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1). N-linked glycosylation affects cell-surface expression and ligand binding. *J Biol Chem.* 2000;275(9):6573-6579.
17. Kerscher B, Dambuza IM, Christofi M, et al. Signalling through MyD88 drives surface expression of the mycobacterial receptors MCL (Clec4e) and Mincle (Clec4e) following microbial stimulation. *Microbes Infect.* 2016;18(7-8):505-509.
18. Pöhlmann S, Zhang J, Baribaud F, et al. Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol.* 2003;77(7):4070-4080.
19. Engering A, Van Vliet SJ, Geijtenbeek TB, Van Kooyk Y. Subset of DC-SIGN(+) dendritic cells in human blood transmits HIV-1 to T lymphocytes. *Blood.* 2002;100(5):1780-1786.
20. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood.* 1989;74(7):2527-2534.
21. Rossol M, Kraus S, Pierer M, Baerwald C, Wagner U. The CD14(bright) CD16⁺ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis Rheum.* 2012;64(3):671-677.
22. Piccioli D, Tavarini S, Borgogni E, et al. Functional specialization of human circulating CD16 and CD1c myeloid dendritic-cell subsets. *Blood.* 2007;109(12):5371-5379.
23. Lundberg K, Rydner F, Greiff L, Lindstedt M. Human blood dendritic cell subsets exhibit discriminative pattern recognition receptor profiles. *Immunology.* 2014;142(2):279-288.
24. Alanne-Kinnunen M, Lappalainen J, Öörni K, Kovanen PT. Activated human mast cells induce LOX-1-specific scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *PLoS One.* 2014;9(9):e108352.
25. Minami M, Kume N, Kataoka H, et al. Transforming growth factor-beta(1) increases the expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;272(2):357-361.
26. Draude G, Lorenz RL. TGF-beta1 downregulates CD36 and scavenger receptor A but upregulates LOX-1 in human macrophages. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278(4):H1042-H1048.
27. Vanaudenaerde BM, De Vleeschouwer SI, Vos R, et al. The role of the IL23/IL17 axis in bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Am J Transplant.* 2008;8(9):1911-1920.
28. Marshall AS, Willment JA, Pyz E, et al. Human MICL (CLEC12A) is differentially glycosylated and is down-regulated following cellular activation. *Eur J Immunol.* 2006;36(8):2159-2169.
29. Bates EE, Fournier N, Garcia E, et al. APCs express DCIR, a novel C-type lectin surface receptor containing an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *J Immunol.* 1999;163(4):1973-1983.
30. Redelinghuys P, Whitehead L, Augello A, et al. MICL controls inflammation in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(7):1386-1391.
31. Uto T, Fukaya T, Takagi H, et al. Clec4A4 is a regulatory receptor for dendritic cells that impairs inflammation and T-cell immunity. *Nat Commun.* 2016;7:11273.
32. LeibundGut-Landmann S, Gross O, Robinson MJ, et al. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol.* 2007;8(6):630-638.

33. Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, et al. Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-kappaB activation through Raf-1 and Syk. *Nat Immunol.* 2009;10(2):203-213.
34. Lee EJ, Brown BR, Vance EE, et al. Mincle activation and the Syk/Card9 signaling axis are central to the development of autoimmune disease of the eye. *J Immunol.* 2016;196(7):3148-3158.
35. Rivera A, Hohl TM, Collins N, et al. Dectin-1 diversifies *Aspergillus fumigatus*-specific T cell responses by inhibiting T helper type 1 CD4 T cell differentiation. *J Exp Med.* 2011;208(2):369-381.
36. Stoppelkamp S, Reid DM, Yeoh J, et al. Murine pattern recognition receptor dectin-1 is essential in the development of experimental autoimmune uveoretinitis. *Mol Immunol.* 2015;67(2 pt B):398-406.
37. Joo H, Upchurch K, Zhang W, et al. Opposing roles of dectin-1 expressed on human plasmacytoid dendritic cells and myeloid dendritic cells in Th2 polarization. *J Immunol.* 2015;195(4):1723-1731.
38. Mahnke K, Guo M, Lee S, et al. The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J Cell Biol.* 2000;151(3):673-684.
39. Underhill DM, Rossnagle E, Lowell CA, Simmons RM. Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood.* 2005;106(7):2543-2550.
40. Svajger U, Anderluh M, Jeras M, Obermajer N. C-type lectin DC-SIGN: an adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity. *Cell Signal.* 2010;22(10):1397-1405.
41. Mori D, Shibata K, Yamasaki S. C-type lectin receptor dectin-2 binds to an endogenous protein β -glucuronidase on dendritic cells. *PLoS One.* 2017;12(1):e0169562.
42. Aragane Y, Maeda A, Schwarz A, Tezuka T, Ariizumi K, Schwarz T. Involvement of dectin-2 in ultraviolet radiation-induced tolerance. *J Immunol.* 2003;171(7):3801-3807.
43. Ariizumi K, Shen GL, Shikano S, et al. Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *J Biol Chem.* 2000;275(26):20157-20167.

*Supplemental Data****Supplemental Materials and Methods***

Generation of Clec1a Knock-out (KO) rats by Zinc Finger Nuclease (ZFN) technology.

In vitro-transcribed mRNA-encoding ZFN-targeted sequences specific for rat *Clec1a* (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) were microinjected in fertilized one-cell stage embryos as previously described^{1,2}. Mutations in newborn were detected by PCR using the following primers 5'-GCCTGCCTTAATTTTGCATC-3' forward; 5'-TTGCCTTTAGAAAGATGAAGGG-3' reverse and were sequenced. One of the founders presented a 7 bp deletion of the following sequence: 5'-ACCACAA-3' leading to a premature stop-codon at the 114 amino-acid of CLEC-1, and thus, lacked most of the extracellular domain. Heterozygotes were subjected to breeding to generate CLEC-1 deficient Knock-Out (KO) and wild-type (WT) littermates.

Western blot on lungs from CLEC-1 deficient rats.

Lung from Wild-type (WT), Heterozygous (HET) or CLEC-1 deficient (KO) rats were lysed on ice in RIPA solution and nuclei and cellular debris was removed by centrifugation for 20 min at 10,000 rpm supplemented with Protease Inhibitors Cocktail (PIC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Lung extracts (300µg) were treated overnight with PNGase F (Sigma-Aldrich) according to manufacturer's instructions. Protein concentration was determined using the BC assays kit with bovine serum albumin (BSA) as standard (Interchim, San Pedro, CA). PVDF membranes were blocked with TBS (Tween-20-Tris buffered saline), 5% BSA and incubated with polyclonal rabbit anti-rat CLEC-1 (0.8 µg/ml) generated as previously described³ or mouse anti-β-actin (0.2 µg/ml) (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) diluted in TBS-1% BSA (1h RT) and then with HRP-goat anti-rabbit (0.1 µg/ml) or anti-mouse IgG (0.3 µg/ml). Detection by chemiluminescence was performed using West Pico chemiluminescence substrate (Thermofisher, Waltham, MA) and protein expression assessed by Las 4000 (Fuji).

Generation of rat CLEC-1 Fc fusion protein.

Supplemental Data

The cDNA encoding the extracellular domain of CLEC-1 (ADK94891 amino acids 74-261), was amplified by PCR and the 5' and 3' ends tagged with ECORI BglII restriction sites, respectively. Following digestion, cDNA products were cloned and insert in-frame into pFUSE-mIgG2Ae1-Fc2 v10 [Fab] (Invivogen, San Diego, CA) vector containing IgG2a Fc fragment mutated on 3 amino-acid to prevent Fc γ RI binding. Plasmids were transfected in eukaryote cells with lipofectamine according to the manufacturers' instructions (ThermoFisher). CLEC-1 Fc was purified from supernatant with HiTrap g affinity column (GE Healthcare Bio-sciences, Pittsburgh, PA), dialysed using a Slide-A-Lyzer dialysis cassette (ThermoFisher) and quantified using BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce). Purity and protein structure was confirmed by SDS-PAGE followed by Coomassie staining and western blot analysis with anti-mouse IgG or anti-rat CLEC-1 antibody as described in western blot section of supplemental Materials and Methods. A control recombinant secreted truncated form of a human embryonic alkaline phosphatase (hSEAP Fc) was generated (pFUSE-SEAP-hFc, Invivogen) and purified under the same conditions than CLEC-1 Fc.

Human cells.

- Human Embryonic Kidney cells (HEK293T) were obtained from American Type Culture Collection.
- Human cells were sorted using the following markers, SSC^{low}CD45⁺CD3⁺ or CD19⁺ for T and B cells respectively, SSC^{high}CD45⁺CD16⁺ for neutrophils and SSC^{low}CD45⁺CD14⁺ for monocytes using mAbs (BD Biosciences) and a FACSAria flow cytometer (BD Biosciences). Purity was >99%.
- Human monocyte-derived DCs (moDCs) were generated as previously described ⁴ from elutriated monocytes cultured for 7 days in complete RPMI 1640 medium (10% endotoxin-free FCS (ThermoFisher) and with 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 1 mM Hepes (all reagents from Sigma-Aldrich)), supplemented with IL-4 and GM-CSF (1000 IU/ml; AbCys, Paris, France).
- Human aortic endothelial cells (HAECs) were isolated and cultured as previously described ⁵.

*Supplemental Data**Transfection of eukaryotes cells.*

2.5X10⁵ HEK were transduced using GeneCellin TM (Eurobio, Toulon, France) with plasmids encoding eGFP-T2A or-eGFP-T2A-human-CLEC1A DNA constructs (2µg) (Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, Germany)). GFP and ectopic human CLEC-1 expression was evaluated by Flow Cytometry and Fluorescence microscopy at 24h post transfection.

Histology on HEK cells.

Adherent transfected Human Embryonic Kidney cells (HEK293T) (cultured on a coverslip overnight) were fixed in 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA) and permeabilized with Triton X100 (0.1%). Cells were stained with anti-hCLEC-1 mAb (D6 clone, Santa Cruz, Dallas, CA) (4 µg/ml) for 1h at room temperature in PBS 1% Fetal Call Serum (Thermofisher), 1% bovine serum albumin and then with secondary Alexa Fluor-568 anti-mouse IgG1 antibodies. After 10 min incubation in PBS containing 1% DAPI, slides were mounted using Prolong Antifade Reagent (Thermofisher) and observed by fluorescence microscopy (Nikon A1 R Si Confocal microscope). Images were obtained (X60 Plan Apo N.A: 1.4, zoom 2) with sequential mode and analyzed by using ImageJ program.

RNA extraction and real-time quantitative RT-PCR

Total RNAs from cells were prepared using Trizol (Thermofisher) according to the manufacturer's instructions. cDNA from human organs (1 to 15 pooled samples) were provided by Human Immune System and MTC Panel I from male or female Caucasians (Clontech Mountain View, CA).

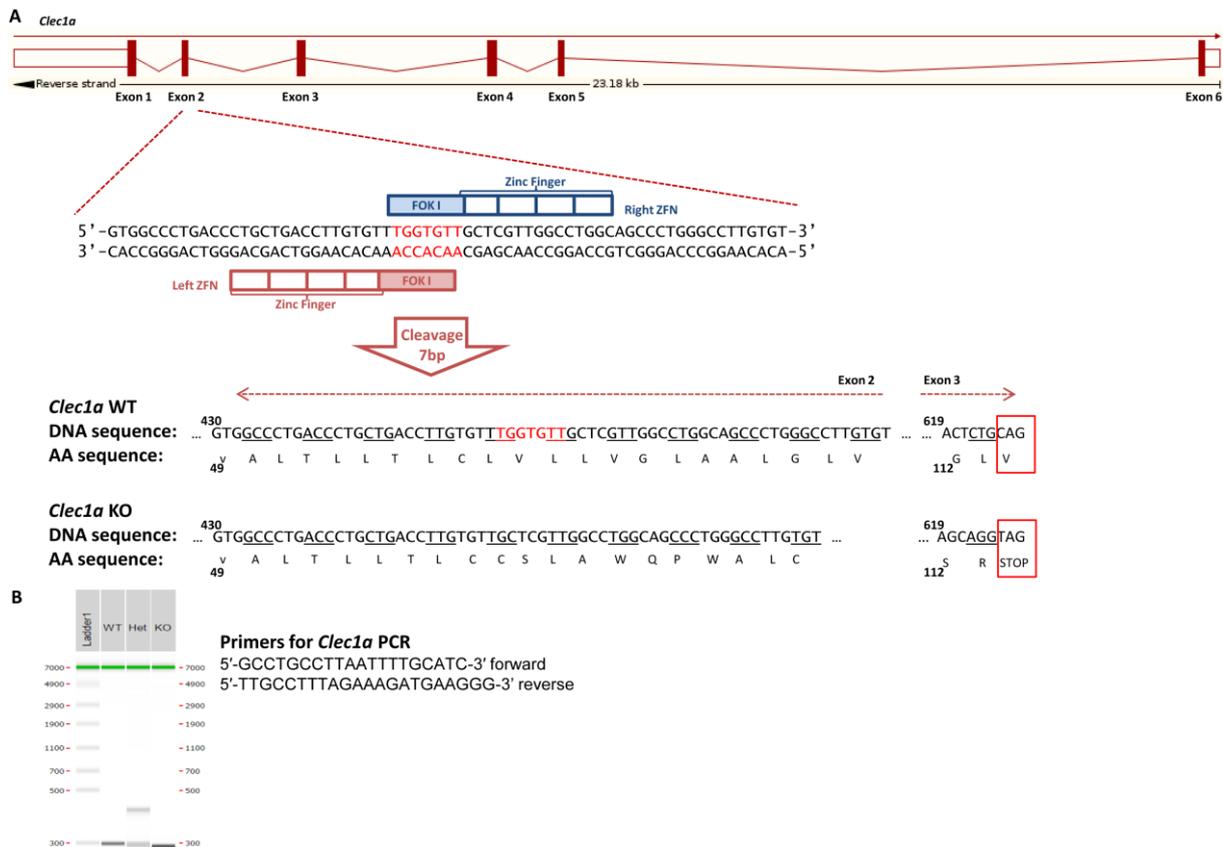
Real-time quantitative PCR was performed using the ViiA 7 Real-Time PCR System and SYBR® Green PCR Master mix (ThermoFisher) as previously described ⁶. Oligonucleotides used are human *HPRT* 5'TAGCCCTCTGTGTGCTCAA 3'CTGATAAAATCTACAGTCATAGGAATGG and human *CLEC1A* 5'TCAGAACTACCGTCCCGAT 3'ACAGGTGCAGATGAAGAGGC. *HPRT* was used as an endogenous control gene for normalization. Relative expression was calculated using the 2^{-ΔΔCt} method ^{6,7} and expressed in arbitrary units (AU) of specific gene/*HPRT* ratio.

Supplemental Data

Supplemental Figures

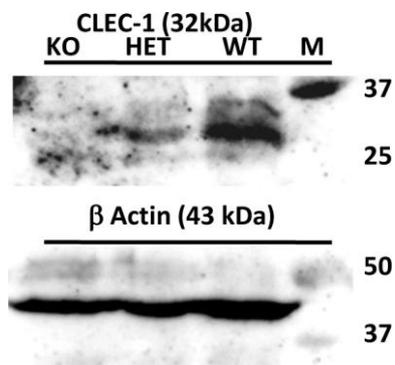
Supplement Figure S1: Strategy of generation and genotyping of *Clec1a* KO rats.

(A) Zinc Finger Nuclease (ZFN) specific of rat *Clec1a* were designed by Sigma and induced a deletion of 7 bp (indicated in red) in exon 2. Amino Acid (AA) of Wild Type (WT) and Knock-Out (KO) rats were represented to demonstrate the generation of a stop codon in the open reading frame at AA 114 in *Clec1a* KO rats. (B) DNA was extracted from tails one week after birth and PCR to detect the 7 bp deletion was performed with the forward and reverse indicated primers. Electrophoresis illustrate results from PCR amplifying the bands for WT (one band 304 bp), Heterozygous (HET) (two bands 304 and 297 bp) and KO (one band 297 bp) rats. Additional larger bands represent formation of heteroduplex DNA double strands with mismatches between the two strands resulting in slower migration during electrophoresis.



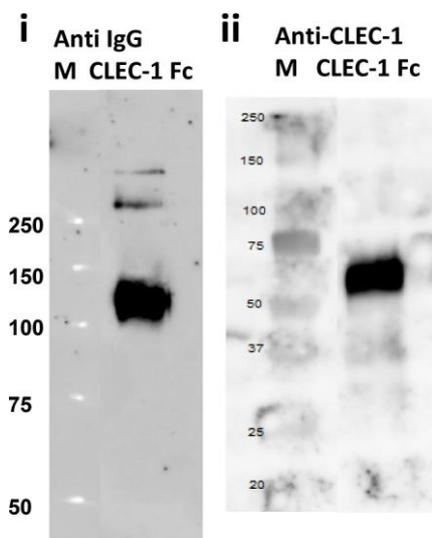
*Supplemental Data***Supplement Figure S2: Absence of CLEC-1 protein in CLEC-1 deficient rats.**

CLEC-1 deficient rats (KO) were generated by ZFN technology and CLEC-1 deficiency was confirmed by western blot as described in Material and Methods in deglycosylated lung extracts from KO, HET and WT rats with anti-rat CLEC-1 polyclonal Ab (expected size 32 kDa) generated as previously described³ and with anti- β -actin mAb as control (expected syze 43kDa). Results are representative of three independent experiments with different animals. M line represents Molecular-weight size markers.



*Supplemental Data***Supplement Figure S3: Generation of rat CLEC-1 Fc fusion protein.**

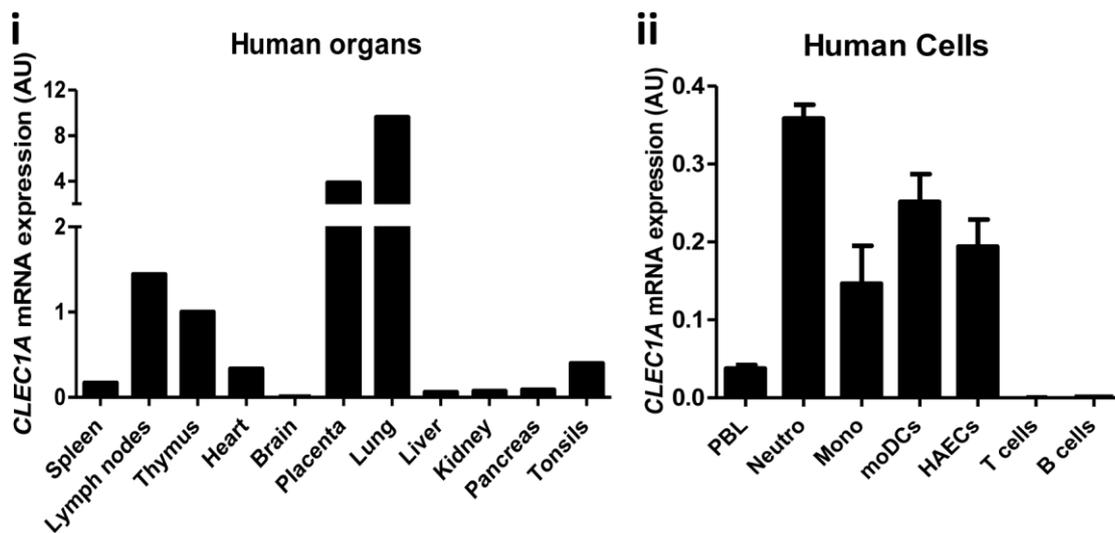
Soluble rat CLEC-1 Fc purified protein was produced in eukaryotes cells transfected with plasmid encoding the extracellular domain of rat CLEC-1 fused to Fc fragment of mouse IgG2a as described in Supplemental Materials and Methods. Western blots analysis of CLEC-1 Fc fusion protein was revealed with **(i)** anti mouse IgG peroxydase in non-denaturing conditions (expected size 130 kDa) and with **(ii)** anti-rat CLEC-1 polyclonal Abs generated as previously described ³ in denaturing conditions (expected syze 65 kDa). M line represents Molecular-weight size markers.



Supplemental Data

Supplement Figure S4: CLEC1A mRNA expression in various human organs and cell-subtypes.

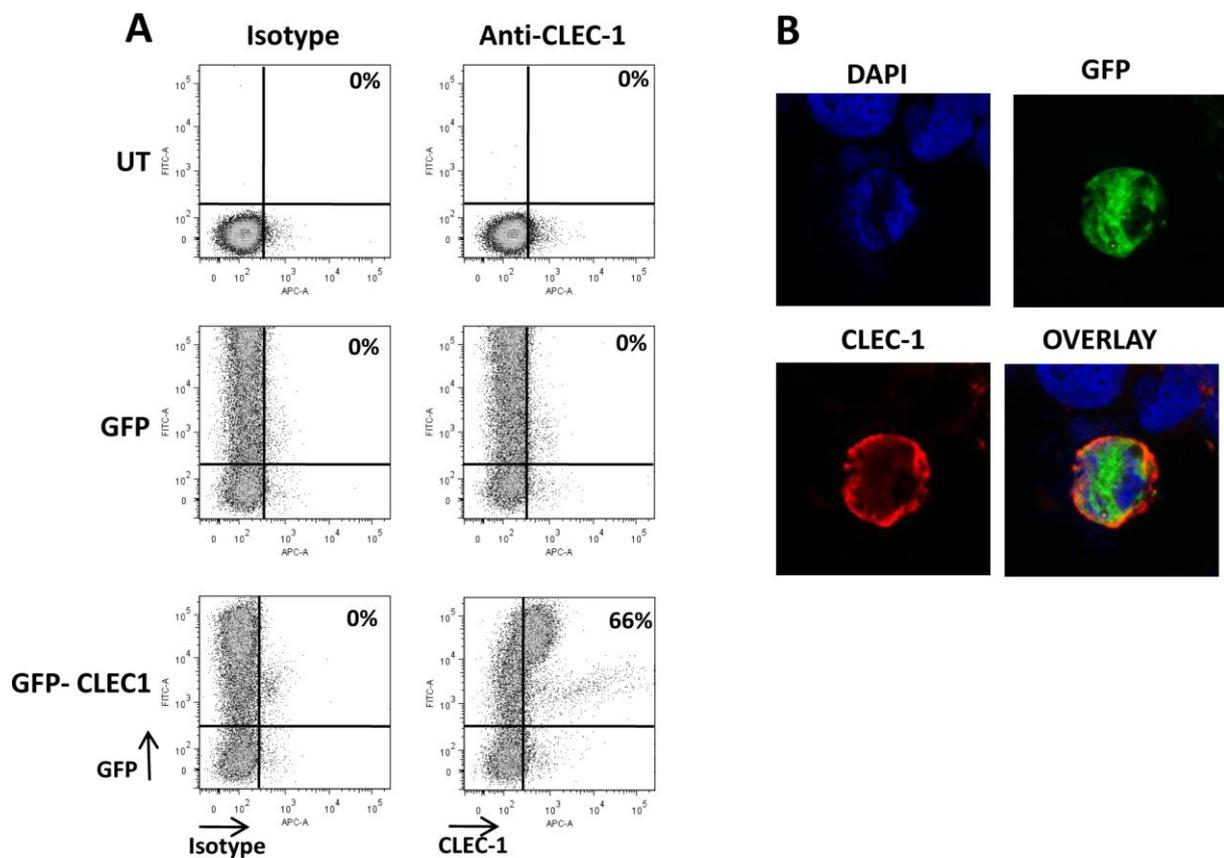
CLEC1A mRNA expression was assessed by quantitative RT-PCR in (i) human organs (from 1 to 15 pooled samples) (histogram is representative of three different run experiments and expressed in Arbitrary Unit (AU) of CLEC1A /HPRT ratio) and in (ii) human peripheral blood leucocytes (PBL), neutrophils (Neutro), monocytes (Mono), monocyte-derived Dendritic Cells (moDCs), Human Aortic Endothelial Cells (HAECs), T and B cells. Results were expressed in histogram as mean \pm SEM of 4 samples and are expressed in Arbitrary Unit (AU) of CLEC1A /HPRT ratio.



Supplemental Data

Supplement Figure S5: Transfection of eukaryotes cells with plasmids encoding GFP and human CLEC1A.

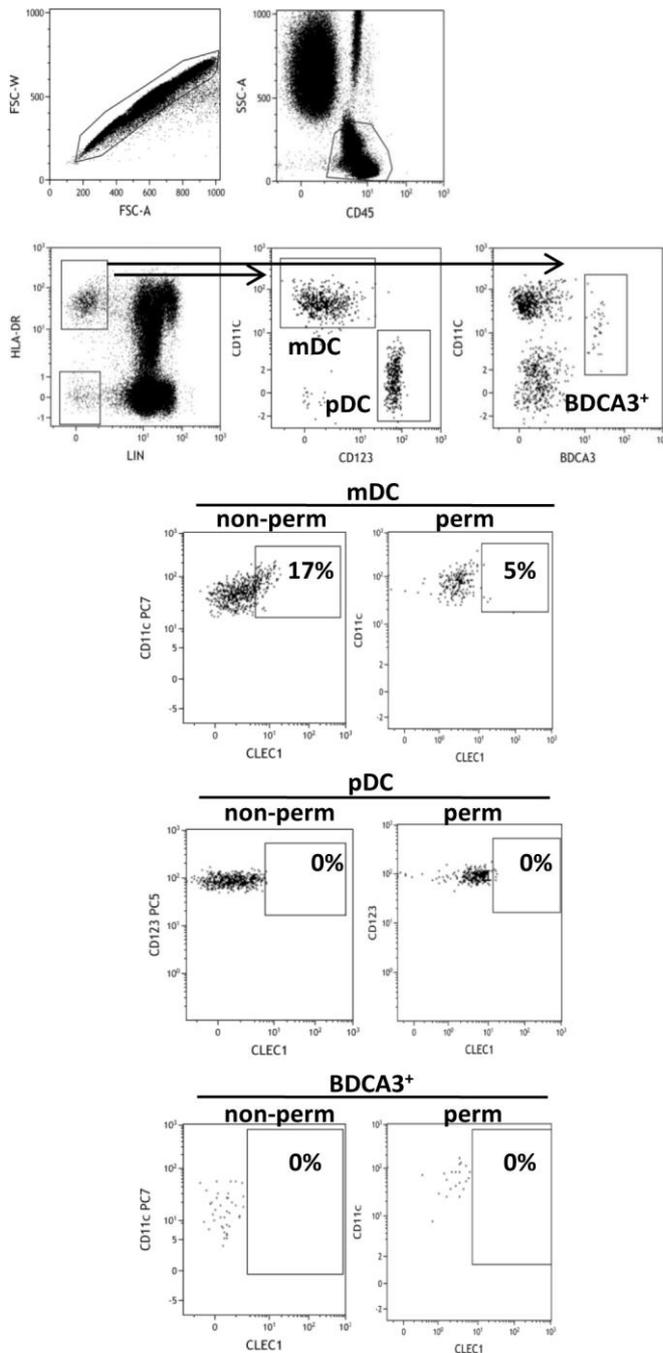
(A) Flow cytometry analysis and **(B)** confocal microscopy images of eukaryote Human Embryonic Kidney (HEK) cells transfected with plasmids encoding *GFP* alone or human *CLEC1A* and *GFP* for 24h. Dot plots exhibit GFP (FITC) and isotype (IgG1) or CLEC-1 (APC) staining revealed by anti-human in house CLEC-1 mAb and evaluated by flow cytometry. Images represent DAPI (blue), GFP (green) and CLEC-1 (red) staining revealed by anti-human CLEC1 mAb (D6 clone) followed by secondary anti-mouse Alexa-568 antibody. Original magnification x600. Data are representative of three independent experiments.



Supplemental Data

Supplement Figure S6: CLEC-1 expression in different subsets of human blood DCs in non-permeabilized and permeabilized conditions.

Representative dot plots of CLEC-1 staining evaluated by flow cytometry in non-permeabilized (non-perm) and permeabilized (perm) conditions in human blood CD45⁺LIN⁻HLA-DR⁺ subpopulation of CD11c⁺CD123⁻ and CD11c⁺BDCA3⁺ myeloid DC (mDC) and CD11c⁻CD123⁺ plasmacytoid DCs (pDC). Data are representative of five independent experiments.



*Supplemental Data***Supplement Figure S7: Rejection grade in lung transplant biopsies and graft outcome.**

Rejection grade was evaluated by anatomical pathology (histopathology) in lung transplant biopsies from the multicentric longitudinal cohort “Cohort in Lung Transplantation” (COLT, NCT00980967) at the indicated time post transplantation. Graft outcome and estimated onset of chronic rejection are indicated for each sample.

No	Time post-transplantation	Grade of rejection	Graft outcome (estimated onset of CR)
1	1 year	0	Stable
2	1 year	0	Stable
3	6 months	0	Stable
4	1 year	0	Stable
5	1 year	0	Stable
6	1 ½ year	0	Stable
7	6 months	0	Stable
8	1 year	0	Stable
9	6 months	1	CR (1 year)
10	1 year	0	CR (3 years)
11	1 year	1	CR (1 year)
12	1 year	0	CR (2 ½ years)
13	6 months	0	CR (1 year)
14	6 months	0	CR (1 year)
15	1 year	0	CR (2 years)

Grade 0 : No interstitial infiltrate, No fibrosis, No endothelial cell injury

Grade 1 : Inflammatory infiltrate

CR (Chronic Rejection)

*Supplemental Data***Supplemental References**

1. Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, et al. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science*. 2009;325(5939):433.
2. Menoret S, Iscache AL, Tesson L, et al. Characterization of immunoglobulin heavy chain knockout rats. *Eur J Immunol*. 2011;40(10):2932-2941.
3. Thebault P, Lhermite N, Tilly G, et al. The C-type lectin-like receptor CLEC-1, expressed by myeloid cells and endothelial cells, is up-regulated by immunoregulatory mediators and moderates T cell activation. *J Immunol*. 2009;183(5):3099-3108.
4. Spisek R, Bretaudeau L, Barbieux I, Meflah K, Gregoire M. Standardized generation of fully mature p70 IL-12 secreting monocyte-derived dendritic cells for clinical use. *Cancer Immunol Immunother*. 2001;50(8):417-427.
5. Le Bas-Bernardet S, Hourmant M, Coupel S, Bignon JD, Souillou JP, Charreau B. Non-HLA-type endothelial cell reactive alloantibodies in pre-transplant sera of kidney recipients trigger apoptosis. *Am J Transplant*. 2003;3(2):167-177.
6. Louvet C, Heslan JM, Merieau E, Souillou JP, Cuturi MC, Chiffolleau E. Induction of Fractalkine and CX3CR1 mediated by host CD8+ T cells in allograft tolerance induced by donor specific blood transfusion. *Transplantation*. 2004;78(9):1259-1266.
7. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408.

Discussion

Discussion

Tout au long de ce projet, plusieurs expériences ont été réalisées dans le but d'approfondir les connaissances sur le récepteur « lectin-like » de type C, CLEC-1, chez l'homme et chez le rat. A l'heure actuelle, peu de recherches ont été menées sur CLEC-1. Les ligands exogènes ou endogènes de CLEC-1 n'ont pas encore été identifiés et rien n'est connu quant à sa signalisation. Cependant, c'est une molécule très conservée au niveau évolutif, et elle fait partie d'une famille de récepteurs impliqués dans la régulation de la réponse immune innée et adaptative. De plus, avant mon arrivée, la mise en évidence par l'équipe, du rôle inhibiteur de CLEC-1 dans les cellules dendritiques de rat sur la polarization Th17 (Thebault et al. 2009), rendait cette recherche très encourageante et intéressante.

Peu de choses étaient connues sur l'expression de CLEC-1 chez l'homme et ceci était uniquement au niveau transcriptionnel. Nous avons donc commencé par l'étude du profil d'expression de CLEC-1 au niveau tissulaire et cellulaire chez l'homme. Cette étude a montré une très forte expression de transcrits de CLEC-1 dans le placenta et les poumons. Ces sont des sites importants de défense immunitaire. Etant donné ses propriétés immunorégulatrices, CLEC-1 pourrait intervenir dans des conditions de réponse immunitaire excessive dans le but de la diminuer. CLEC-1 est également exprimé mais de manière plus modérée dans les organes lymphoïdes comme le thymus, la rate, les ganglions lymphatiques et les amygdales.

L'analyse de l'expression des transcrits de CLEC-1 dans les différents sous-types cellulaires a montré un fort niveau d'expression dans les neutrophiles, les monocytes, les cellules dendritiques dérivées des monocytes (moDCs) et les cellules endothéliales HAECs (Human aortic endothelial cells). Par immunoprécipitation de CLEC-1 et western blot, nous avons confirmé au niveau protéique le fort niveau d'expression de CLEC-1 dans les moDCs et dans les cellules endothéliales comme les HAECs et les HUVECs (Human umbilical vein endothelial cells). Nous n'avons pas observé d'expression de CLEC-1 dans les cellules HEKs (Human embryonic kidney cells). Ces cellules ont donc permis l'expression ectopique de CLEC-1 humain suite à une transfection et la validation d'un anticorps monoclonal dirigé contre le domaine extracellulaire de CLEC-1 humain. Cet anticorps anti CLEC-1 humain a été généré par une biotech (Biotem)

suite à l'immunisation de souris avec un peptide (20 mers) du domaine CRD de CLEC-1. Nous avons confirmé par immunohistochimie l'expression de CLEC1 à la surface cellulaire. Cependant cette expression ectopique était très difficile à obtenir et était plus ou moins faible. Ceci était en adéquation avec les études précédentes (Colonna, Samaridis, and Angman 2000; Sobanov et al. 2001; Kataoka et al. 2000), qui montraient une expression intracellulaire de CLEC-1 uniquement et qui suggéraient la nécessité d'une autre molécule adaptatrice pour sa stabilité à la membrane cellulaire. Nous avons donc co-transfecté les cellules HEKs avec CLEC-1 et les adaptateurs DAP12 et FcR γ , qui sont impliquées dans la signalisation de certains CLR s mais cela n'a pas induit d'augmentation de l'expression ectopique de CLEC-1. Ce résultat pose de nouvelles hypothèses, comme le besoin de la présence du ligand de CLEC-1 pour se transporter de façon stable au niveau de la surface cellulaire, ou le besoin d'autres chaînes adaptatrices, de l'expression de d'autres CLR s ou PRR s ou de glycosylations pour sa production, stabilité et transport à la surface cellulaire.

Néanmoins, la validation de notre anticorps monoclonal nous a permis d'être les premiers à étudier l'expression de CLEC-1 au niveau protéique chez l'homme. De façon très intéressante, nous avons montré par cytométrie en flux l'expression de CLEC-1 chez l'homme par une sous-population particulière de cellules dendritiques conventionnelles du sang, les cDC s CD16 $^-$ et par les monocytes CD14 $^+$ CD16 $^+$. Ces deux sous-populations de cellules ont été décrites dans la littérature pour leurs propriétés pro-inflammatoires et pour leur rôle dans l'expansion des cellules Th17 (Passlick, Flieger, and Ziegler-Heitbrock 1989; Rossol et al. 2012; Piccioli et al. 2007; Lundberg et al. 2014). Cependant, nous n'avons pas observé d'expression de CLEC-1 dans d'autres sous-types de cellules dendritiques comme les myéloïdes BDCA3 $^+$ et les plasmacytoides CD123 $^+$, ni à la surface cellulaire, ni en intracellulaire. En revanche, l'expression de CLEC-1 est importante au niveau intracellulaire dans les neutrophiles et dans les cellules endothéliales. Nous avons également montré dans les moDC s une co-expression de CLEC-1 à la surface cellulaire avec le récepteur lectin de type C DC-SIGN. A la différence des cellules dendritiques du sang, cette expression n'est pas restreinte à la sous-population CD16 $^-$. Finalement, et de façon importante, en accord avec ce qui avait été montré précédemment chez le rat (Thebault et al. 2009), l'expression de

CLEC-1 est diminuée par des stimuli pro-inflammatoires comme les ligands de TLRs, et en revanche est augmentée par le TGF- β .

L'analyse de ces résultats montre que le profil, la localisation, et la régulation de CLEC-1 chez l'homme, comme d'autres CLR's tels que LOX-1 et DC-SIGN (Alanne-Kinnunen et al. 2014; Minami et al. 2000; Draude and Lorenz 2000), sont dépendants des sous-types cellulaires et aussi de son environnement. CLEC-1, de façon similaire à DC-SIGN (Engering et al. 2002), n'est exprimé que par certains sous- types cellulaires dans le sang. Cependant, il est largement exprimé dans les moDCs, et son expression est modulée positivement par la cytokine immunosuppressive TGF- β . L'expression de CLEC-1 pourrait donc augmenter dans des conditions très particulières comme un environnement immunosupprimé riche en TGF- β , et ce dans le but de réguler une réponse immunitaire excessive.

Afin d'étudier la fonction de CLEC-1 dans les cellules dendritiques chez l'homme, nous avons utilisé l'anticorps monoclonal (cross-linké) pour mimer le ligand et donc stimuler le récepteur. CLEC-1 contient dans son domaine intra-cytoplasmique un amino-acide avec un potentiel de phosphorylation très important, la tyrosine. Cependant, nous n'avons pas observé de phosphorylation au niveau de cette tyrosine de CLEC-1 (32KDa) par western blot après stimulation des moDCs avec l'anticorps, mais en revanche, nous avons observé des changements importants dans le profil de phosphorylations de protéines d'environ 40-50 KDa. Une protéine apparaît plus phosphorylée alors qu'une autre l'est moins. Ceci suggère que CLEC-1 est un récepteur actif qui signale, et qui génère des cascades de phosphorylations ou de déphosphorylations suggérant l'activation de kinases et/ou de phosphatases ; ce qui est commun pour d'autres CLR's (cf Introduction partie II). Cette expérience nous a donc permis de prouver la fonctionnalité de notre anticorps, il reste maintenant à identifier les protéines impliquées dans les voies de signalisation. A noter cependant que l'activation par l'anticorps n'est pas physiologique et pourrait induire une voie de signalisation différente de celles induites par les ligands endogènes ou exogènes. Il est donc urgent d'identifier les ligands de CLEC-1 pour étudier finement les voies de signalisation induites par chaque ligand. Nous collaborons avec Gordon Brown un éminent spécialiste en CLR's (Aberdeen, uk) et il essaye d'identifier les ligands exogènes

de CLEC-1 en testant par Biacore l'interaction avec différents composés pathogéniques (également par puces à protéines/carbohydriques). De notre côté, nous envisageons de déterminer les ligands endogènes de CLEC-1 par biacore suivie de spectrométrie de masse (protéine recombinante CLEC-1 humaine sur laquelle est passée des lysats cellulaires, puis ce qui sera accroché sera passé en spectrométrie de masse (plateforme protein, Rennes).

Par la suite, nous avons voulu déterminer si la stimulation de CLEC-1 avec l'anticorps pourrait intervenir positivement ou négativement sur la maturation et l'activation des moDCs par lui-même ou induites par d'autres PRRs (ligand TLR et zymosan). Nous avons d'abord regardé la modulation des marqueurs d'activation CD80, CD86, CD86 et HLA-DR suite à la stimulation et nous n'avons pas observé de différence. Nous avons regardé ensuite par ELISA la production de cytokines comme le TNF, l'IL-12p70, l'IL-6, l'IL-23, et l'IL-10 et aucune différence n'a été observée. Cependant, afin d'étudier le rôle de CLEC-1 dans la polarisation des cellules Th dans une réponse cellulaire allogénique, nous avons co-cultivé des moDCs préalablement stimulées avec l'anticorps avec des cellules T allogéniques. Nous n'avons pas observé de différences au niveau de la prolifération, mais, de façon très intéressante, la production d'IL-17 était diminuée alors que la production d'IFN- γ était augmentée.

Ces résultats montrent chez l'homme le rôle de CLEC-1, par lui-même ou en combinaison d'autres PRRs, dans l'inhibition de la différenciation des cellules Th17.

Dans le but de consolider ces résultats, une étude en parallèle a été faite chez le rat. Précédemment notre équipe avait montré chez le rat le rôle de CLEC-1 dans les DCs dans l'inhibition de la réponse Th17 par la technique de siRNA (Thebault et al. 2009). Dans le but de confirmer et d'approfondir cette hypothèse, nous avons fait générer des rats knockout (KO) pour CLEC-1 par la technique des Zinc-finger nucleases. Nous avons commencé par regarder l'impact de l'absence de CLEC-1 chez l'animal. Nos rats KO étaient viables et ne montraient pas de signes de développement de maladies auto-immunes au long terme. Nous avons regardé également les différentes sous-populations cellulaires myéloïdes et lymphoïdes à l'état de repos et nous n'avons pas observé de modifications entre les animaux WT et ceux KO.

L'équipe avait précédemment montré que CLEC-1 est exprimé par les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BMDCs) chez le rat (Thebault et al. 2009). Ce fait nous a permis de générer des BMDCs à partir des nos rats KO et de les comparer avec des BMDCs Wildtype (WT) pour étudier le rôle de CLEC-1 sur le phénotype et la fonction de ces cellules. Nous avons d'abord regardé l'effet de l'absence de CLEC-1 sur la maturation et l'activation des BMDCs plus ou moins induites par d'autres PRRs. Nous n'avons pas observé de différences de maturation des cellules d'après les marqueurs CD80, CD86, et les CMHs de classe I et II. En revanche, nous avons observé au niveau des transcrits de cytokines une augmentation de l'expression de la sous-unité IL-12p40 dans des conditions non stimulées et suite à la stimulation avec du LPS (ligand du TLR-4) et du zymosan (ligand du TLR-2 et de Dectin-1). Egalement, l'expression de la sous-unité IL-12p35 était augmentée dans la condition de stimulation avec du zymosan. Cependant, aucune irrégularité n'a été observée dans l'expression des cytokines IL-6, IL-23p19, IL-10 et TGF- β . En outre, nous avons étudié l'effet de l'absence de CLEC-1 dans les BMDCs dans la polarisation d'une réponse Th allogénique. L'absence de CLEC-1 dans les BMDCs induit une augmentation de la prolifération des cellules T allogéniques dans des conditions de non stimulation et suite à la stimulation avec du LPS et du zymosan. Cette augmentation de prolifération était associée à une augmentation du nombre de cellules Th17 (c'est-à-dire productrices d'IL-17).

L'ensemble des résultats de cette étude *in vitro* dans les BMDCs confirme l'implication de CLEC-1 dans les DCs dans l'inhibition de la polarisation des cellules Th17. De façon intéressante, cette inhibition pourrait être expliquée par la modulation de la sous-unité IL-12p40 qui est à la fois importante pour la production des cytokines IL-23, polarisant des Th17, et IL-12, polarisant des Th1. Par exemple, contrairement à nos résultats, il a été montré que le CLR activateur Dectin-1 induit une augmentation de l'expression d'IL-12p40 dans les DCs, ce qui induit la production d'IL-23 et d'IL-12 responsables de façon respective de la polarisation de la réponse Th vers les Th17 et Th1 (LeibundGut-Landmann et al. 2007; Gringhuis et al. 2009).

Afin de prouver que les résultats observés étaient bien dus à l'absence de CLEC-1 dans les BMDCs lors de la polarisation des T, et pas dus à un biais de développement

de ces cellules en l'absence de CLEC-1 dans les rats KO, l'équipe avait généré une protéine de fusion (CLEC-1-Fc). Cette protéine est composée du domaine extracellulaire de CLEC-1 de rat et d'un fragment Fc d' IgG2a de souris muté sur 3 acides aminés (pour empêcher l'accrochage aux récepteurs Fc des immunoglobulines). CLEC-1-Fc pourrait donc bloquer les interactions du récepteur CLEC-1 avec son ligand. Nous avons d'abord regardé si la protéine de fusion avait un effet agoniste direct sur un ligand possiblement exprimé par les cellules T. Nous n'avons pas observé d'effet sur la prolifération ou la sécrétion d'IFN- γ ou d'IL-17 par les lymphocytes T (suite à une stimulation avec l'anti-CD3 et la protéine de fusion coatés au plastique). Il ne semble pas qu'il y ait un ligand de CLEC-1 directement sur les LT mais ceci reste à confirmer. Le ligand de CLEC-1 pourrait donc être exprimé par les BMDCs elles-mêmes ou relargué dans le surnageant à partir des BMDCs ou des cellules T durant la MLR. En accord avec les résultats obtenus précédemment, la présence de la protéine CLEC-1-Fc dans une MLR induit une augmentation de la prolifération des cellules T allogéniques associée également à une augmentation de la production de la cytokine IL-17. Ces résultats confirment donc que l'effet observé dans la réponse Th17 allogénique est vraiment dû à l'absence de signalisation de CLEC-1 dans les BMDCs.

Ces résultats ouvrent également des pistes à explorer pour identifier les ligands de CLEC-1. Le ligand de CLEC-1 pourrait être un ligand endogène libéré de façon naturelle à l'environnement, ou associé au dommage cellulaire. Par exemple il a été montré dans la littérature que Dectin-2 était un récepteur capable de détecter des molécules libérées par les DCs elles-mêmes (Mori, Shibata, and Yamasaki 2017). Egalement Dectin-2 pourrait reconnaître des ligands hypothétiques liés aux cellules T régulatrices qui induiraient ensuite une suppression de la réponse immune (Aragane et al. 2003). Un possible ligand endogène provenant des cellules T a été également montré pour Dectin-1, qui, à l'inverse de CLEC-1, agit comme un récepteur activateur de la réponse T immunitaire (Ariizumi et al. 2000). Le récepteur CLR MINCLE reconnaît la protéine SAP130 relargué lors de la nécrose des cellules (Yamasaki et al. 2008). CLEC-1 pourrait être un récepteur d'alerte capable de reconnaître des ligands endogènes relargués par apoptose ou nécrose lors de dommages tissulaires et de

réponse immunitaire excessive pour ensuite inhiber cette réponse et limiter l'inflammation.

Dans le but de renforcer les résultats de cette étude *in vitro* sur la fonctionnalité de CLEC-1 dans les DCs, nous avons également développé des modèles *in vivo*. L'objectif ici est d'étudier le rôle de CLEC-1 dans une réponse Th dépendante de la présentation antigénique par les DCs suite à des immunisations *in vivo*. Deux modèles ont été mis en place. Pour le premier modèle, nous avons effectué une immunisation sous-cutanée avec l'antigène exogène « Keyhole limpet hemocyanin » (KLH) et l'adjuvant complet de Freund (CFA) chez le rat. La KLH sera donc présentée *in vivo* par les DCs aux cellules T CD4⁺. Nous regardons ensuite *in vitro* la réponse secondaire spécifique de la KLH. Nous avons observé une augmentation de la prolifération des cellules T CD4⁺ spécifiques à la KLH provenant des rats KO suite à une activation secondaire *in vitro*. Cette augmentation était également associée à une augmentation des cellules productrices d'IL-17, d'INF- γ et d'IL-17 et IFN- γ à la fois. Ensuite nous avons généré des rats chimériques (Rats WT irradiés et reconstitués avec la moelle osseuse provenant des rats KO) afin de prouver que ces résultats sont bien dus à l'absence de CLEC-1 dans le système hématopoïétique et non dans le système stromal (notamment expression forte de CLEC-1 dans les cellules endothéliales). De manière très importante, les résultats obtenus ont été similaires aux précédents et confirment que l'augmentation de la réponse immunitaire contre la KLH est liée à l'absence de CLEC-1 dans le système hématopoïétique dont myéloïde. Ces résultats pourraient être un reflet d'une réponse immunitaire primaire plus forte ou d'une immunorégulation de la réponse moins importante en l'absence de CLEC-1.

Pour le deuxième modèle, nous avons greffé nos rats WT et KO avec des cœurs allogéniques. L'absence de CLEC-1 n'a pas modulé la cinétique du rejet. Cependant, nous avons observé une augmentation dans la prolifération des cellules T purifiées suite à une stimulation secondaire *in vitro*. Également, nous avons observé une augmentation de l'expression d'IL-17 dans le greffon ce qui suggère une plus forte activation des cellules Th17 chez les rats KO.

L'ensemble des résultats de cette étude *in vivo* a donc suggéré un rôle de CLEC-1 dans l'inhibition du « priming » des DCs et dans la polarisation de la réponse immunitaire Th vers les Th17 et Th1.

Nous avons observé dans nos études *in vitro*, chez l'homme et chez le rat, que la stimulation de CLEC-1 en combinaison ou non avec d'autres ligands des PRRs inhibe l'activation des Th17 en particulier. Cependant, notre étude *in vivo* montre le rôle inhibiteur de CLEC-1 dans l'activation des Th17 et aussi des Th1. Le CFA utilisé dans l'immunisation *in vivo* est composé d'une large quantité de ligands spécifiques de différents PRRs (Stoppelkamp et al. 2015). Ce fait suggère que CLEC-1 pourrait inhiber l'activation des Th17 ou Th1 de manière dépendante aux ligands et à la stimulation d'autres PRRs. Par exemple, il a été montré que l'activation de Dectin-1 par *Candida albicans* ou le ligand Curdlan chez la souris, entraîne la polarisation de la réponse Th vers les Th17 et Th1 (Gringhuis et al. 2009). Cependant, en réponse à *Aspergillus fumigatus*, Dectin-1 favorise la réponse Th17 par l'inhibition de la réponse Th1 (Rivera et al. 2011).

A l'heure actuelle, rien n'est connu en ce qui concerne la signalisation de CLEC-1. Cependant, son domaine intracytoplasmique comprend un motif composé d'une séquence d'acides aminés contenant une tyrosine et un autre motif triacidic. Les CLR vont déclencher des voies de signalisation particulières en fonction des ligands et activer différemment des domaines cytoplasmiques. Il a été montré que la stimulation de Dectin-1 induit en fonction du ligand deux voies parallèles classiques d'activation du NFκB, l'une dépendante de la protéine kinase Syk (liée au domaine ITAM), et l'autre dépendante de Raf (liée au domaine triacide). Cette co-activation permet la phosphorylation et l'acétylation du NFκB dans sa forme dimérique p65-p50 ce qui induit l'activation des gènes codant pour des cytokines polarisantes Th17 et Th1 (Gringhuis et al. 2009). Afin d'expliquer le rôle de CLEC-1 dans l'inhibition des Th17 et Th1, nous avons voulu approfondir ses mécanismes de signalisation. Nous avons montré chez l'homme que CLEC-1 était un récepteur fonctionnel suite à la stimulation avec notre anticorps monoclonal. CLEC-1 pourrait inhiber l'activation de la voie du NFκB classique dépendante de SYK. Cette voie commence par l'activation de SYK qui permet la formation du complexe Card-9 nécessaire pour l'induction et l'activation

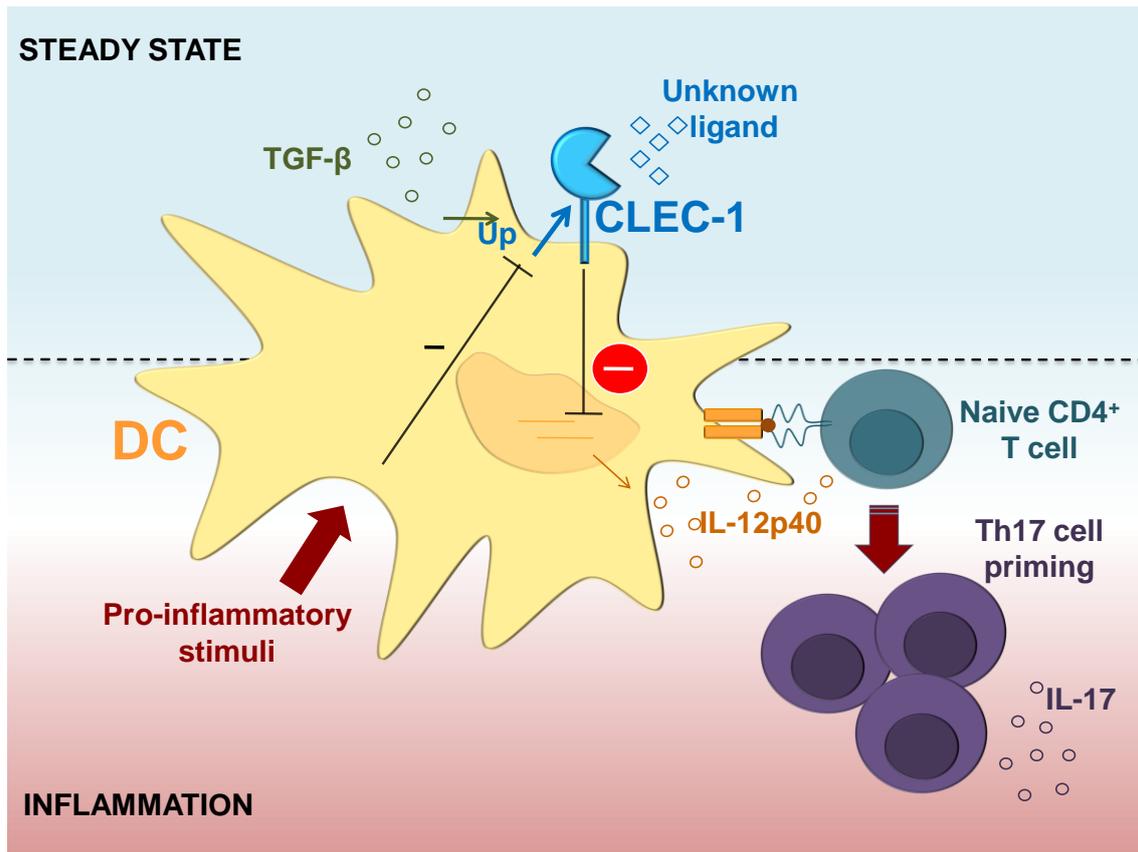
d'un autre complexe, l'IKK. Ce complexe IKK phosphoryle l'inhibiteur du NFκB, l'IKBα ce qui va permettre sa dégradation par le protéasome et donc la libération et la translocation au noyau de NFκB. Nous avons évalué par western blot la phosphorylation d'IKBα et donc sa dégradation suite à la stimulation avec l'anticorps et en présence ou non de zymosan (ligand du TLR-2 et de Dectin-1). Nous avons observé que l'activation de CLEC-1 n'induit pas par lui-même l'activation classique du NFκB dépendante de Syk. Elle ne module pas non plus l'activation induite par le zymosan. Ces résultats excluent l'hypothèse dans laquelle CLEC-1 pourrait inhiber la différenciation des Th17 et Th1 par l'inhibition de la voie classique du NFκB dépendante de Syk. Ce fait nous a permis de considérer de nouvelles hypothèses qui restent à élucider: une première où CLEC-1 pourrait inhiber la voie classique dépendante de Raf; et une deuxième où CLEC-1 pourrait activer une troisième voie non classique dépendante de la protéine NIK décrite dans la littérature pour activer le NFκB dans une forme dimérique répresseur du gène codant pour la sous-unité IL-12p40 (Geijtenbeek and Gringhuis 2009).

Enfin, afin de consolider nos résultats dans un contexte clinique, et étant donné la très forte expression de CLEC-1 dans le poumon, nous avons investigué sa modulation d'expression dans des biopsies provenant de patients stables ou qui ensuite plus tard ont développé un rejet chronique (CR) de la greffe pulmonaire. Aucun signe histopathologique de rejet n'a pas été observé chez les biopsies provenant de patients CR au moment de son prélèvement. En revanche, nous avons montré que l'expression de CLEC-1 était diminuée et également associée à une augmentation de l'expression d'IL-17. Les niveaux d'expression d'IFN-γ et de TGF-β étaient similaires. Ces données suggèrent que la forte expression de CLEC-1 dans le poumon, non seulement pourrait avoir un rôle de défense contre des pathogènes, mais pourrait aussi être ensuite cruciale pour tempérer la réponse adaptative à travers l'inhibition des Th17 pour limiter une inflammation excessive.

Notre équipe avait identifié précédemment CLEC-1 comme sur-exprimé dans un modèle de tolérance à l'allogreffe dépendante du TGF-β. En outre, nous avons également montré que les cellules CD4⁺ CD25⁺ régulatrices augmentent l'expression de CLEC-1 dans les cellules endothéliales et myéloïdes et sont nécessaires pour l'inhibition

de la réponse Th17 (Thebault et al. 2009). De manière importante, notre étude au niveau clinique reste en accord avec ces preuves scientifiques précédentes. Cela permet donc de cibler CLEC-1 comme un outil thérapeutique très important dans l'inhibition de la réponse cellulaire Th17 et plus particulièrement dans le poumon.

Ce travail nous a donc permis de mieux caractériser CLEC-1. Il s'agit de la première description du profil d'expression de CLEC-1 au niveau protéique dans les différents sous-types cellulaires chez l'homme. Les résultats chez l'homme et chez le rat ont montré que CLEC-1 était un récepteur inhibiteur présent à la surface cellulaire des cellules dendritiques. Comme d'autres CLR, aux propriétés tolérogènes, son expression est diminuée par des stimuli pro-inflammatoires, mais en revanche est augmentée par la cytokine immunosuppressive TGF- β . L'activation de la signalisation de CLEC-1 diminue l'expression de la sous-unité IL-12p40 et, inhibe plus particulièrement la réponse Th17 consécutive. Comme il a été montré pour d'autres CLR, CLEC-1 pourrait également inhiber la réponse Th1 et ceci pourrait dépendre du ligand et de la co-activation avec d'autres PRRs. Nous avons montré, au niveau de la signalisation, que cet effet n'est pas dû à l'inhibition de l'activation du NF κ B par la voie classique dépendante du Syk. Cependant deux autres hypothèses ont été mentionnées et devraient être explorées. Finalement, nous avons consolidé nos résultats dans un contexte clinique, qui, en accord avec les preuves scientifiques montrées précédemment, ciblent CLEC-1 comme un potentiel outil thérapeutique.



En conclusion, CLEC-1, étant un récepteur inhibiteur de surface cellulaire, pourrait représenter une cible thérapeutique potentielle pour moduler la réponse immune en transplantation, auto-immunité, cancérologie, et maladies infectieuses. L'expression de CLEC-1 semble dépendante du sous-type cellulaire et de l'environnement (environnement riche en TGFb). Ce fait est important en vue de la fabrication de traitements les plus spécifiques possibles. CLEC-1 ouvre donc des perspectives très intéressantes à explorer et à valider.

Perspectives :

1. Investiguer les possibles ligands exogènes et endogènes reconnus par CLEC1.

L'équipe est en collaboration avec l'équipe de G. Brown (Aberdeen fungal group, section immunology and infection, University of Aberdeen, UK) pour l'identification de ligands exogènes potentiels de CLEC-1.

L'équipe est également en collaboration avec l'entreprise OSE Immunotherapeutics dirigée par Bernard Vanhove pour l'identification de ligands endogènes potentiels de CLEC-1.

2. Investiguer les mécanismes impliqués dans l'inhibition de la différenciation des Th17 par CLEC-1.

Trois nouveaux objectifs émergent de ce travail de thèse :

- Etudier la signalisation de CLEC-1 dans les DCs chez l'homme et chez le rat.

Nous avons montré que CLEC-1 était un récepteur fonctionnel, il reste maintenant à identifier les protéines recrutées et impliquées dans la signalisation de CLEC-1. CLEC-1 est un récepteur avec un domaine intracytoplasmique composé de deux motifs décrits au niveau structurel : l'un de ces motifs contient des acides aminés tyrosine et sérine ayant un potentiel de phosphorylation très important pour le recrutement de la protéine kinase SYK, qui est bien décrite pour son rôle dans l'activation de NF- κ B (Geijtenbeek and Gringhuis 2009); l'autre est un motif triacide aussi présent et décrit au niveau fonctionnel pour d'autres CLR. La connaissance de la structure de son domaine cytoplasmique et les connaissances sur d'autres domaines similaires ont orienté nos recherches afin d'expliquer la diminution d'expression d'IL-12p40 (impliquée dans la différenciation des Th17) montrée dans ce travail. Nous avons montré que cette diminution n'est pas due à l'inhibition de la voie d'activation du NF- κ B classique dépendant de SYK. Ces résultats ouvrent sur deux nouvelles hypothèses :

- CLEC-1 pourrait inhiber l'activation de la voie classique dépendante de Raf activée par d'autres CLR_s responsables de la surexpression d'IL-12p40 (Geijtenbeek and Gringhuis 2009) (Figure 15). Afin de prouver cette hypothèse, l'équipe pourra regarder l'impact de l'activation de CLEC-1 (exclusive ou par l'ensemble de l'activation d'autres PRR_s) sur la phosphorylation de la protéine Raf. Egalement la phosphorylation (Ser 273) et l'acétylation de la sous-unité p65 du dimère NF- κ B (p65-p50) transloqué au noyau suite à l'activation par la voie classique dépendante de Syk. Les techniques utilisées seront la cytométrie en flux et le western Blot, avec l'utilisation d'anticorps spécifiques.
- CLEC-1 pourrait activer une troisième voie non classique dépendante de la protéine NIK responsable de la répression d'IL-12p40 (Geijtenbeek and Gringhuis 2009) (Figure 15). Pour vérifier cette hypothèse, l'équipe regardera l'impact de l'activation de CLEC-1 (exclusive ou par l'ensemble de l'activation d'autres PRR_s) sur la phosphorylation de la protéine NIK, et également sur la translocation, et donc la présence dans le noyau de la sous-unité Relb du dimère NF- κ B (RelB-p52) par western Blot.

La phosphorylation (Ser 273) de la sous-unité p65 du dimère NF κ B (p65-p50) peut également interagir avec la voie d'activation non classique dépendante du NIK. En effet, la sous-unité p65 phosphorylée au niveau de la Ser 273 a une forte affinité pour la sous-unité RelB du dimère NF- κ B (RelB-p52) ce qui permet la formation d'un nouveau dimère NF- κ B inhibiteur de l'activation des gènes comme CCL17 et CCL22 et qui empêche la répression d'IL-12p40 (Geijtenbeek and Gringhuis 2009). Il est donc important d'investiguer l'impact de CLEC-1 (exclusive ou par l'ensemble de l'activation d'autres PRR_s) sur l'expression des chimiokines CCL22 et CCL17.

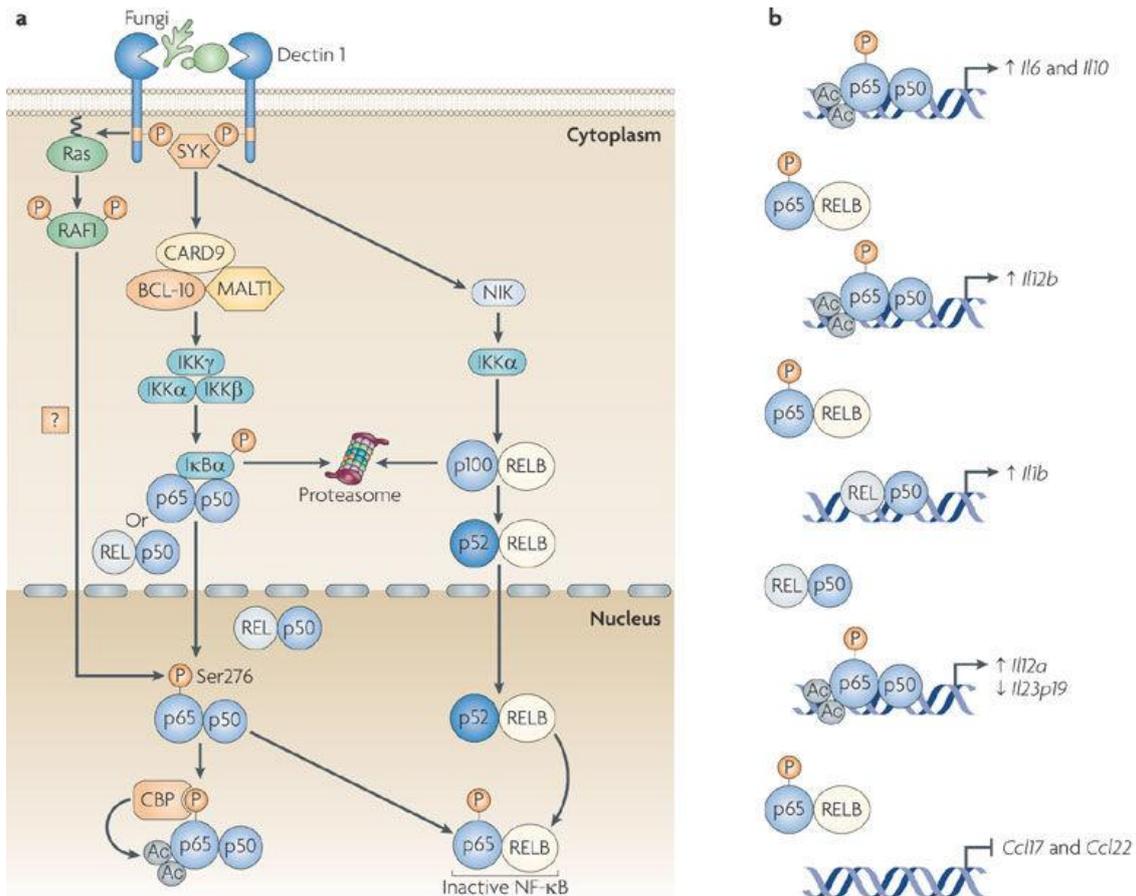


Figure 15. Voies d'activation du NF-κB par Dectin-1.

D'après Geijtenbeek and Gringhuis (Geijtenbeek and Gringhuis 2009).

- Comprendre les mécanismes d'action du récepteur CLEC-1 sur la différenciation des TH17

Nous avons montré dans cette étude que l'activation de CLEC-1 n'affectait pas la maturation des DCs chez l'homme et chez le rat caractérisée par les marqueurs CD80, CD86, CMH de classe I et de classe II. Cependant, les DCs de rat ont montré une diminution de l'expression de la sous-unité d'IL-12p40 essentielle à la polarisation Th17.

Afin de conforter ces résultats et de comprendre les mécanismes impliqués dans l'inhibition des Th17 par CLEC-1, il serait intéressant de faire :

- Une étude plus large de l'impact de CLEC-1 sur les molécules de maturation et sur le profil des cytokines exprimées par les DCs stimulées *in vitro*. Par exemple, l'équipe de SangKon Oh montre le rôle de Dectin-1 dans la polarisation des cellules Th par la modulation du ligand OX40 (Joo et al. 2015). Egalement, Zakharova et Ziegler montrent l'inhibition de l'IL-12p40 par le TNF- α dans les cellules dendritiques (Zakharova and Ziegler 2005). Il serait donc intéressant de regarder l'expression de ces molécules plus particulièrement. Les molécules de maturation et les cytokines d'intérêt seraient regardées de préférence suite à une stimulation des DCs par le TGF- β afin d'augmenter l'expression de CLEC-1 par les DCs et donc accentuer son effet.
- Une étude du phénotype et du profil d'expression des cytokines des DCs conventionnelles présentes dans la rate suite à des immunisations *in vivo* par différents ligands des PRRs. Chez le rat, deux sous-populations de cDCs ont été identifiées par l'équipe : les cDCs CD4⁻ et les cDC CD4⁺ correspondant respectivement aux cDCs CD8⁺ et cDCs DC8⁻ de souris. L'équipe regardera d'abord l'expression de CLEC-1 par ces deux sous-types de cDCs par PCR quantitative, puis le profil d'expression des cytokines et marqueurs de maturation par cytométrie en flux et par PCR quantitative afin de confirmer les résultats des expériences *in vitro*.
 - o Consolider les résultats avec de nouveaux modèles d'immunisation *in vivo*.

Le modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimental (EAE), plus spécifique de la réponse Th17 (van der Fits et al. 2009), permettrait de conforter toute notre étude. Par ailleurs, un modèle de tolérance à l'allogreffe dépendant du TGF- β permettrait de potentialiser les effets de CLEC-1 dont l'expression serait augmentée par le TGF- β (Thebault et al. 2009).

3. Investiguer le rôle potentiel de CLEC-1 dans le cancer

D'après les bases de données, nous avons observé que CLEC-1 était particulièrement plus exprimé par les cDCs CD8⁺ chez la souris. Comme décrit dans l'introduction, les cDCs CD8⁺ sont caractérisées pour leur rôle importante dans la cross-présentation d'antigènes aux cellules T CD8⁺ et leur différenciation en cellules T cytotoxiques (Savina et al. 2009). Ce fait nous a encouragé à investiguer chez le rat l'expression de CLEC-1 par les cDCs CD4⁺ (correspondant aux cDCs CD8⁻ de souris) et par les cDCs CD4⁻ (correspondant aux cDCs CD8⁺ de souris). Chez le rat, CLEC-1 pourrait également être plus particulièrement exprimé par la sous-population de cDCs CD4⁻ et donc avoir un rôle très important dans la cross-présentation.

La cross-présentation, qui induit l'activation de la réponse T cytotoxique, est un des mécanismes cibles de la recherche en cancérologie. De façon très intéressante, il a récemment été montré que CLEC-1 était surexprimés dans les tumeurs (Wu, Jordan, and Waxman 2016; Theodoulou et al. 2016).

CLEC-1, étant un récepteur inhibiteur surexprimé dans un microenvironnement tolérant riche en TGF- β , devient une cible très intéressante dans le domaine de la cancérologie. Le blocage de CLEC-1 pourrait potentialiser la réponse immunitaire contre la tumeur et inhiber le développement de métastases. Plusieurs objectifs ont été fixés par l'équipe :

- Etudier le rôle potentiel de CLEC-1 dans la cross-présentation d'Ag par les DCs.

Tout d'abord, il serait intéressant de vérifier l'expression de CLEC-1 par la sous-population de cDCs CD8⁺ chez la souris, responsables de la cross-présentation d'antigènes tumoraux et correspondant aux cDCs CD4⁻ du rat exprimant CLEC-1. Si les cDCs CD8⁺ expriment CLEC-1, nous pourrions ensuite étudier le potentiel de CLEC-1 dans la cross-présentation par les DCs *in vitro* et *in vivo* chez la souris.

- Etudier le rôle potentiel de CLEC-1 dans le développement tumoral *in vivo*.

Deux modèles seront mis en place pour déterminer l'impact de CLEC-1 sur le développement de la tumeur et de métastases : un modèle de gliome C6 chez le rat, et un modèle d'hépatocarcinome chez la souris.

Egalement l'équipe pourra regarder l'impact de l'injection de notre protéine de fusion CLEC-1-Fc dans le modèle de gliome C6. La protéine pourrait bloquer l'interaction de CLEC-1 avec son ligand (exprimé peut être par la tumeur) et favoriser la réponse immunitaire contre la tumeur.

- Etudier la corrélation de l'expression de CLEC-1 avec le stade/type de Cancer.

L'équipe pourra caractériser quelle tumeur et par quels types de cellules est surexprimé CLEC-1 par la technique d'immunohistochimie à partir de « Solid tumors Biocollections ».

Il serait intéressant de déterminer les sous-populations de macrophages associés aux tumeurs (TAM = tumor-associated macrophages) qui expriment CLEC-1 par immunohistochimie et également par cytométrie. Il existe deux populations de macrophages qui ont été associés aux tumeurs, les M1 et les M2. Les M2 ont été décrites pour leurs propriétés tolérogènes qui favorisent le développement de la tumeur (Yamaguchi et al. 2016). CLEC-1 pourrait être exprimé par cette sous-population des macrophages. Si l'hypothèse est validée, il pourrait être bénéfique de bloquer CLEC-1 afin d'inhiber le développement tumoral.

Bibliographie

Bibliographie :

- Afzali, Behdad, Giovanna Lombardi, and Robert I. Lechler. 2008. "Pathways of Major Histocompatibility Complex Allorecognition." *Current Opinion in Organ Transplantation* 13 (4): 438–44. doi:10.1097/MOT.0b013e328309ee31.
- Alanne-Kinnunen, Mervi, Jani Lappalainen, Katariina Öörni, and Petri T. Kovanen. 2014. "Activated Human Mast Cells Induce LOX-1-Specific Scavenger Receptor Expression in Human Monocyte-Derived Macrophages." *PLoS One* 9 (9): e108352. doi:10.1371/journal.pone.0108352.
- Anderson, G., K. M. Partington, and E. J. Jenkinson. 1998. "Differential Effects of Peptide Diversity and Stromal Cell Type in Positive and Negative Selection in the Thymus." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 161 (12): 6599–6603.
- Aragane, Yoshinori, Akira Maeda, Agatha Schwarz, Tadashi Tezuka, Kiyoshi Ariizumi, and Thomas Schwarz. 2003. "Involvement of Dectin-2 in Ultraviolet Radiation-Induced Tolerance." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 171 (7): 3801–7.
- Ariizumi, K., G. L. Shen, S. Shikano, S. Xu, R. Ritter, T. Kumamoto, D. Edelbaum, A. Morita, P. R. Bergstresser, and A. Takashima. 2000a. "Identification of a Novel, Dendritic Cell-Associated Molecule, Dectin-1, by Subtractive cDNA Cloning." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (26): 20157–67. doi:10.1074/jbc.M909512199.
- Baba, Tomohisa, Yasunari Nakamoto, and Naofumi Mukaida. 2009. "Crucial Contribution of Thymic Sirtap Alpha+ Conventional Dendritic Cells to Central Tolerance against Blood-Borne Antigens in a CCR2-Dependent Manner." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183 (5): 3053–63. doi:10.4049/jimmunol.0900438.
- Bates, E. E., N. Fournier, E. Garcia, J. Valladeau, I. Durand, J. J. Pin, S. M. Zurawski, et al. 1999. "APCs Express DCIR, a Novel C-Type Lectin Surface Receptor Containing an Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory Motif." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 163 (4): 1973–83.
- Bedoui, Sammy, Paul G. Whitney, Jason Waithman, Liv Eidsmo, Linda Wakim, Irina Caminschi, Rhys S. Allan, et al. 2009. "Cross-Presentation of Viral and Self Antigens by Skin-Derived CD103+ Dendritic Cells." *Nature Immunology* 10 (5): 488–95. doi:10.1038/ni.1724.
- Behler, Friederike, Regina Maus, Jennifer Bohling, Sarah Knippenberg, Gabriele Kirchhof, Masahiro Nagata, Danny Jonigk, et al. 2015. "Macrophage-Inducible C-Type Lectin Mincle-Expressing Dendritic Cells Contribute to Control of Splenic Mycobacterium Bovis BCG Infection in Mice." *Infection and Immunity* 83 (1): 184–96. doi:10.1128/IAI.02500-14.
- Belz, Gabrielle T., Sammy Bedoui, Fiona Kupresanin, Francis R. Carbone, and William R. Heath. 2007. "Minimal Activation of Memory CD8+ T Cell by Tissue-Derived Dendritic Cells Favors the Stimulation of Naive CD8+ T Cells." *Nature Immunology* 8 (10): 1060–66. doi:10.1038/ni1505.
- Bensinger, S. J., A. Bandeira, M. S. Jordan, A. J. Caton, and T. M. Laufer. 2001. "Major Histocompatibility Complex Class II-Positive Cortical Epithelium Mediates the Selection of CD4(+)25(+) Immunoregulatory T Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 194 (4): 427–38.
- Bogunovic, Milena, Florent Ginhoux, Julie Helft, Limin Shang, Daigo Hashimoto, Melanie Greter, Kang Liu, et al. 2009. "Origin of the Lamina Propria Dendritic Cell Network." *Immunity* 31 (3): 513–25. doi:10.1016/j.immuni.2009.08.010.
- Bonasio, Roberto, M. Lucila Scimone, Patrick Schaerli, Nir Grabie, Andrew H. Lichtman, and Ulrich H. von Andrian. 2006. "Clonal Deletion of Thymocytes by Circulating Dendritic

- Cells Homing to the Thymus." *Nature Immunology* 7 (10): 1092–1100. doi:10.1038/ni1385.
- Bougnères, Laurence, Julie Helft, Sangeeta Tiwari, Pablo Vargas, Benny Hung-Junn Chang, Lawrence Chan, Laura Campisi, et al. 2009. "A Role for Lipid Bodies in the Cross-Presentation of Phagocytosed Antigens by MHC Class I in Dendritic Cells." *Immunity* 31 (2): 232–44. doi:10.1016/j.immuni.2009.06.022.
- Brändle, D., J. Joergensen, G. Zenke, K. Bürki, and R. P. Hof. 1998. "Contribution of Donor-Specific Antibodies to Acute Allograft Rejection: Evidence from B Cell-Deficient Mice." *Transplantation* 65 (11): 1489–93.
- Brewig, Nancy, Adrien Kissenpfennig, Bernard Malissen, Alexandra Veit, Thomas Bickert, Bernhard Fleischer, Sven Mostböck, and Uwe Ritter. 2009. "Priming of CD8+ and CD4+ T Cells in Experimental Leishmaniasis Is Initiated by Different Dendritic Cell Subtypes." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182 (2): 774–83.
- Brunet, J. F., F. Denizot, M. F. Luciani, M. Roux-Dosseto, M. Suzan, M. G. Mattei, and P. Golstein. 1987. "A New Member of the Immunoglobulin Superfamily--CTLA-4." *Nature* 328 (6127): 267–70. doi:10.1038/328267a0.
- Bugaric, Andrea, Kelly Hitchens, Anthony G. Beckhouse, Christine A. Wells, Robert B. Ashman, and Helen Blanchard. 2008. "Human and Mouse Macrophage-Inducible C-Type Lectin (Mincle) Bind *Candida Albicans*." *Glycobiology* 18 (9): 679–85. doi:10.1093/glycob/cwn046.
- Caskey, Marina, Florian Klein, Julio C. C. Lorenzi, Michael S. Seaman, Anthony P. West, Noreen Buckley, Gisela Kremer, et al. 2015. "Viraemia Suppressed in HIV-1-Infected Humans by Broadly Neutralizing Antibody 3BNC117." *Nature* 522 (7557): 487–91. doi:10.1038/nature14411.
- Chen, Jung-Tsu, Chein-Hung Chen, Ko-Li Ku, Michael Hsiao, Chun-Pin Chiang, Tsui-Ling Hsu, Min-Huey Chen, and Chi-Huey Wong. 2015. "Glycoprotein B7-H3 Overexpression and Aberrant Glycosylation in Oral Cancer and Immune Response." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (42): 13057–62. doi:10.1073/pnas.1516991112.
- Chiffolleau, Elise, Gaëlle Bériou, Patrick Dutartre, Claire Usal, Jean-Paul Soulillou, and Maria Cristina Cuturi. 2002a. "Role for Thymic and Splenic Regulatory CD4+ T Cells Induced by Donor Dendritic Cells in Allograft Tolerance by LF15-0195 Treatment." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168 (10): 5058–69.
- Chiffolleau. 2002b. "Induction of Donor-Specific Allograft Tolerance by Short-Term Treatment with LF15-0195 after Transplantation. Evidence for a Direct Effect on T-Cell Differentiation." *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2 (8): 745–57.
- Colonna, M., J. Samaridis, and L. Angman. 2000a. "Molecular Characterization of Two Novel C-Type Lectin-like Receptors, One of Which Is Selectively Expressed in Human Dendritic Cells." *European Journal of Immunology* 30 (2): 697–704. doi:10.1002/1521-4141(200002)30:2<697::AID-IMMU697>3.0.CO;2-M.
- Conde, Patricia, Mercedes Rodriguez, William van der Touw, Ana Jimenez, Matthew Burns, Jennifer Miller, Manisha Brahmachary, et al. 2015. "DC-SIGN(+) Macrophages Control the Induction of Transplantation Tolerance." *Immunity* 42 (6): 1143–58. doi:10.1016/j.immuni.2015.05.009.
- Coomes, Janine L., Karima R. R. Siddiqui, Carolina V. Arancibia-Cárcamo, Jason Hall, Cheng-Ming Sun, Yasmine Belkaid, and Fiona Powrie. 2007. "A Functionally Specialized Population of Mucosal CD103+ DCs Induces Foxp3+ Regulatory T Cells via a TGF-Beta and Retinoic Acid-Dependent Mechanism." *The Journal of Experimental Medicine* 204 (8): 1757–64. doi:10.1084/jem.20070590.

- Coquet, Jonathan M., Julie C. Ribot, Nikolina Bąbała, Sabine Middendorp, Gerda van der Horst, Yanling Xiao, Joana F. Neves, et al. 2013. "Epithelial and Dendritic Cells in the Thymic Medulla Promote CD4+Foxp3+ Regulatory T Cell Development via the CD27-CD70 Pathway." *The Journal of Experimental Medicine* 210 (4): 715–28. doi:10.1084/jem.20112061.
- Croft, Michael, Takanori So, Wei Duan, and Pejman Soroosh. 2009. "The Significance of OX40 and OX40L to T-Cell Biology and Immune Disease." *Immunological Reviews* 229 (1): 173–91. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00766.x.
- Daley, Donnele, Vishnu R. Mani, Navyatha Mohan, Neha Akkad, Atsuo Ochi, Daniel W. Heindel, Ki Buom Lee, et al. 2017. "Dectin 1 Activation on Macrophages by Galectin 9 Promotes Pancreatic Carcinoma and Peritumoral Immune Tolerance." *Nature Medicine* 23 (5): 556–67. doi:10.1038/nm.4314.
- Dambuza, Ivy M., and Gordon D. Brown. 2015. "C-Type Lectins in Immunity: Recent Developments." *Current Opinion in Immunology* 32 (February): 21–27. doi:10.1016/j.coi.2014.12.002.
- Dardalhon, Valérie, Amit Awasthi, Hyoung Kwon, George Galileos, Wenda Gao, Raymond A. Sobel, Meike Mitsdoerffer, et al. 2008. "IL-4 Inhibits TGF-Beta-Induced Foxp3+ T Cells And, Together with TGF-Beta, Generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) Effector T Cells." *Nature Immunology* 9 (12): 1347–55. doi:10.1038/ni.1677.
- Degauque, Nicolas, David Lair, Alexandre Dupont, Anne Moreau, Gwénaelle Roussey, Frédérique Moizant, François Xavier Hubert, et al. 2006. "Dominant Tolerance to Kidney Allografts Induced by Anti-Donor MHC Class II Antibodies: Cooperation between T and Non-T CD103+ Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 176 (7): 3915–22.
- Dorner, Brigitte G., Martin B. Dorner, Xuefei Zhou, Corinna Opitz, Ahmed Mora, Steffen Güttler, Andreas Hutloff, et al. 2009. "Selective Expression of the Chemokine Receptor XCR1 on Cross-Presenting Dendritic Cells Determines Cooperation with CD8+ T Cells." *Immunity* 31 (5): 823–33. doi:10.1016/j.immuni.2009.08.027.
- Draude, G., and R. L. Lorenz. 2000. "TGF-beta1 Downregulates CD36 and Scavenger Receptor A but Upregulates LOX-1 in Human Macrophages." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 278 (4): H1042-1048.
- Dudziak, Diana, Alice O. Kamphorst, Gordon F. Heidkamp, Veit R. Buchholz, Christine Trumpheller, Sayuri Yamazaki, Cheolho Cheong, et al. 2007. "Differential Antigen Processing by Dendritic Cell Subsets in Vivo." *Science (New York, N.Y.)* 315 (5808): 107–11. doi:10.1126/science.1136080.
- Edelson, Brian T., Tara R. Bradstreet, Wumesh Kc, Kai Hildner, Jeremy W. Herzog, Julia Sim, John H. Russell, Theresa L. Murphy, Emil R. Unanue, and Kenneth M. Murphy. 2011. "Batf3-Dependent CD11b(low/-) Peripheral Dendritic Cells Are GM-CSF-Independent and Are Not Required for Th Cell Priming after Subcutaneous Immunization." *PloS One* 6 (10): e25660. doi:10.1371/journal.pone.0025660.
- Edelson, Brian T., Wumesh Kc, Richard Juang, Masako Kohyama, Loralyn A. Benoit, Paul A. Klekotka, Clara Moon, et al. 2010. "Peripheral CD103+ Dendritic Cells Form a Unified Subset Developmentally Related to CD8alpha+ Conventional Dendritic Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 207 (4): 823–36. doi:10.1084/jem.20091627.
- Engering, Anneke, Teunis B. H. Geijtenbeek, Sandra J. van Vliet, Mietske Wijers, Ellis van Liempt, Nicolas Demaurex, Antonio Lanzavecchia, et al. 2002. "The Dendritic Cell-Specific Adhesion Receptor DC-SIGN Internalizes Antigen for Presentation to T Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168 (5): 2118–26.
- Engering, Anneke, Sandra J. Van Vliet, Teunis B. H. Geijtenbeek, and Yvette Van Kooyk. 2002. "Subset of DC-SIGN(+) Dendritic Cells in Human Blood Transmits HIV-1 to T Lymphocytes." *Blood* 100 (5): 1780–86. doi:10.1182/blood-2001-12-0179.

- Eyerich, Stefanie, Kilian Eyerich, Davide Pennino, Teresa Carbone, Francesca Nasorri, Sabatino Pallotta, Francesca Cianfarani, et al. 2009. "Th22 Cells Represent a Distinct Human T Cell Subset Involved in Epidermal Immunity and Remodeling." *The Journal of Clinical Investigation* 119 (12): 3573–85. doi:10.1172/JCI40202.
- Ezzelarab, M. B., A. F. Zahorchak, L. Lu, A. E. Morelli, G. Chalasani, A. J. Demetris, F. G. Lakkis, et al. 2013. "Regulatory Dendritic Cell Infusion Prolongs Kidney Allograft Survival in Nonhuman Primates." *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 13 (8): 1989–2005. doi:10.1111/ajt.12310.
- Farrand, Kathryn J., Nina Dickgreber, Patrizia Stoitzner, Franca Ronchese, Troels R. Petersen, and Ian F. Hermans. 2009. "Langerin+ CD8alpha+ Dendritic Cells Are Critical for Cross-Priming and IL-12 Production in Response to Systemic Antigens." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183 (12): 7732–42. doi:10.4049/jimmunol.0902707.
- Fehres, Cynthia M., Wendy W. J. Unger, Juan J. Garcia-Vallejo, and Yvette van Kooyk. 2014. "Understanding the Biology of Antigen Cross-Presentation for the Design of Vaccines against Cancer." *Frontiers in Immunology* 5: 149. doi:10.3389/fimmu.2014.00149.
- Fink, P. J., and M. J. Bevan. 1978. "H-2 Antigens of the Thymus Determine Lymphocyte Specificity." *The Journal of Experimental Medicine* 148 (3): 766–75.
- Fithian, E., P. Kung, G. Goldstein, M. Rubenfeld, C. Fenoglio, and R. Edelson. 1981. "Reactivity of Langerhans Cells with Hybridoma Antibody." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (4): 2541–44.
- Fits, Leslie van der, Sabine Mourits, Jane S. A. Voerman, Marius Kant, Louis Boon, Jon D. Laman, Ferry Cornelissen, et al. 2009. "Imiquimod-Induced Psoriasis-like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182 (9): 5836–45. doi:10.4049/jimmunol.0802999.
- Fontenot, Jason D., Jeffrey P. Rasmussen, Marc A. Gavin, and Alexander Y. Rudensky. 2005. "A Function for Interleukin 2 in Foxp3-Expressing Regulatory T Cells." *Nature Immunology* 6 (11): 1142–51. doi:10.1038/ni1263.
- Fresno, Carlos del, Didier Soulat, Susanne Roth, Katrina Blazek, Irina Udalova, David Sancho, Jürgen Ruland, and Carlos Ardavin. 2013. "Interferon- β Production via Dectin-1-Syk-IRF5 Signaling in Dendritic Cells Is Crucial for Immunity to *C. Albicans*." *Immunity* 38 (6): 1176–86. doi:10.1016/j.immuni.2013.05.010.
- Fu, F., Y. Li, S. Qian, L. Lu, F. Chambers, T. E. Starzl, J. J. Fung, and A. W. Thomson. 1996. "Costimulatory Molecule-Deficient Dendritic Cell Progenitors (MHC Class II+, CD80dim, CD86-) Prolong Cardiac Allograft Survival in Nonimmunosuppressed Recipients." *Transplantation* 62 (5): 659–65.
- Fujikado, Noriyuki, Shinobu Saijo, Tomo Yonezawa, Kazusuke Shimamori, Akina Ishii, Sho Sugai, Hayato Kotaki, Katsuko Sudo, Masato Nose, and Yoichiro Iwakura. 2008. "Dcir Deficiency Causes Development of Autoimmune Diseases in Mice due to Excess Expansion of Dendritic Cells." *Nature Medicine* 14 (2): 176–80. doi:10.1038/nm1697.
- Ganesan, Sandhya, Vijay A. K. Rathinam, Lukas Bossaller, Kelly Army, William J. Kaiser, Edward S. Mocarski, Christopher P. Dillon, et al. 2014. "Caspase-8 Modulates Dectin-1 and Complement Receptor 3-Driven IL-1 β Production in Response to β -Glucans and the Fungal Pathogen, *Candida Albicans*." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 193 (5): 2519–30. doi:10.4049/jimmunol.1400276.
- Geijtenbeek, Teunis B. H., and Sonja I. Gringhuis. 2009. "Signalling through C-Type Lectin Receptors: Shaping Immune Responses." *Nature Reviews. Immunology* 9 (7): 465–79. doi:10.1038/nri2569.
- Geijtenbeek. 2016. "C-Type Lectin Receptors in the Control of T Helper Cell Differentiation." *Nature Reviews. Immunology* 16 (7): 433–48. doi:10.1038/nri.2016.55.

- Geijtenbeek, Teunis B. H., Sandra J. Van Vliet, Estella A. Koppel, Marta Sanchez-Hernandez, Christine M. J. E. Vandenbroucke-Grauls, Ben Appelmeik, and Yvette Van Kooyk. 2003. "Mycobacteria Target DC-SIGN to Suppress Dendritic Cell Function." *The Journal of Experimental Medicine* 197 (1): 7–17.
- George, Thaddeus C., Janine Bilsborough, Joanne L. Viney, and Anne M. Norment. 2003. "High Antigen Dose and Activated Dendritic Cells Enable Th Cells to Escape Regulatory T Cell-Mediated Suppression in Vitro." *European Journal of Immunology* 33 (2): 502–11. doi:10.1002/immu.200310026.
- GeurtsvanKessel, Corine H., Monique A. M. Willart, Leonie S. van Rijt, Femke Muskens, Mirjam Kool, Chantal Baas, Kris Thielemans, et al. 2008. "Clearance of Influenza Virus from the Lung Depends on Migratory langerin+CD11b- but Not Plasmacytoid Dendritic Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 205 (7): 1621–34. doi:10.1084/jem.20071365.
- Giannoukakis, Nick, Brett Phillips, David Finegold, Jo Harnaha, and Massimo Trucco. 2011. "Phase I (Safety) Study of Autologous Tolerogenic Dendritic Cells in Type 1 Diabetic Patients." *Diabetes Care* 34 (9): 2026–32. doi:10.2337/dc11-0472.
- Ginhoux, Florent, Kang Liu, Julie Helft, Milena Bogunovic, Melanie Greter, Daigo Hashimoto, Jeremy Price, et al. 2009. "The Origin and Development of Nonlymphoid Tissue CD103+ DCs." *The Journal of Experimental Medicine* 206 (13): 3115–30. doi:10.1084/jem.20091756.
- Ginhoux, Florent, Frank Tacke, Veronique Angeli, Milena Bogunovic, Martine Loubeau, Xu-Ming Dai, E. Richard Stanley, Gwendalyn J. Randolph, and Miriam Merad. 2006. "Langerhans Cells Arise from Monocytes in Vivo." *Nature Immunology* 7 (3): 265–73. doi:10.1038/ni1307.
- Goodridge, Helen S., Takahiro Shimada, Andrea J. Wolf, Yen-Michael S. Hsu, Courtney A. Becker, Xin Lin, and David M. Underhill. 2009. "Differential Use of CARD9 by Dectin-1 in Macrophages and Dendritic Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182 (2): 1146–54.
- Gringhuis, Sonja I., Jeroen den Dunnen, Manja Litjens, Bert van Het Hof, Yvette van Kooyk, and Teunis B. H. Geijtenbeek. 2007a. "C-Type Lectin DC-SIGN Modulates Toll-like Receptor Signaling via Raf-1 Kinase-Dependent Acetylation of Transcription Factor NF-kappaB." *Immunity* 26 (5): 605–16. doi:10.1016/j.immuni.2007.03.012.
- Gringhuis, Sonja I., Jeroen den Dunnen, Manja Litjens, Michiel van der Vlist, and Teunis B. H. Geijtenbeek. 2009. "Carbohydrate-Specific Signaling through the DC-SIGN Signalosome Tailors Immunity to Mycobacterium Tuberculosis, HIV-1 and Helicobacter Pylori." *Nature Immunology* 10 (10): 1081–88. doi:10.1038/ni.1778.
- Gringhuis, Sonja I., Jeroen den Dunnen, Manja Litjens, Michiel van der Vlist, Brigitte Wevers, Sven C. M. Bruijns, and Teunis B. H. Geijtenbeek. 2009a. "Dectin-1 Directs T Helper Cell Differentiation by Controlling Noncanonical NF-kappaB Activation through Raf-1 and Syk." *Nature Immunology* 10 (2): 203–13. doi:10.1038/ni.1692.
- Gringhuis, Sonja I., Tanja M. Kaptein, Brigitte A. Wevers, Bart Theelen, Michiel van der Vlist, Teun Boekhout, and Teunis B. H. Geijtenbeek. 2012. "Dectin-1 Is an Extracellular Pathogen Sensor for the Induction and Processing of IL-1 β via a Noncanonical Caspase-8 Inflammasome." *Nature Immunology* 13 (3): 246–54. doi:10.1038/ni.2222.
- Gringhuis, Sonja I., Tanja M. Kaptein, Brigitte A. Wevers, Michiel van der Vlist, Elsenoor J. Klaver, Irma van Die, Lianne E. M. Vriend, Marein A. W. P. de Jong, and Teunis B. H. Geijtenbeek. 2014. "Fucose-Based PAMPs Prime Dendritic Cells for Follicular T Helper Cell Polarization via DC-SIGN-Dependent IL-27 Production." *Nature Communications* 5 (October): 5074. doi:10.1038/ncomms6074.
- Gringhuis, Sonja I., Brigitte A. Wevers, Tanja M. Kaptein, Toni M. M. van Capel, Bart Theelen, Teun Boekhout, Esther C. de Jong, and Teunis B. H. Geijtenbeek. 2011. "Selective C-Rel

- Activation via Malt1 Controls Anti-Fungal T(H)-17 Immunity by Dectin-1 and Dectin-2." *PLoS Pathogens* 7 (1): e1001259. doi:10.1371/journal.ppat.1001259.
- Gross, Olaf, Andreas Gewies, Katrin Finger, Martin Schäfer, Tim Sparwasser, Christian Peschel, Irmgard Förster, and Jürgen Ruland. 2006. "Card9 Controls a Non-TLR Signalling Pathway for Innate Anti-Fungal Immunity." *Nature* 442 (7103): 651–56. doi:10.1038/nature04926.
- Guilliams, Martin, Karine Crozat, Sandrine Henri, Samira Tamoutounour, Pierre Grenot, Elisabeth Devilard, Béatrice de Bovis, Lena Alexopoulou, Marc Dalod, and Bernard Malissen. 2010. "Skin-Draining Lymph Nodes Contain Dermis-Derived CD103(-) Dendritic Cells That Constitutively Produce Retinoic Acid and Induce Foxp3(+) Regulatory T Cells." *Blood* 115 (10): 1958–68. doi:10.1182/blood-2009-09-245274.
- Hadeiba, Husein, Katharina Lahl, Abdolhossein Edalati, Cecilia Oderup, Aida Habtezion, Russell Pachynski, Linh Nguyen, Asma Ghodsi, Sarah Adler, and Eugene C. Butcher. 2012. "Plasmacytoid Dendritic Cells Transport Peripheral Antigens to the Thymus to Promote Central Tolerance." *Immunity* 36 (3): 438–50. doi:10.1016/j.immuni.2012.01.017.
- Hammer, Gianna Elena, and Averil Ma. 2013. "Molecular Control of Steady-State Dendritic Cell Maturation and Immune Homeostasis." *Annual Review of Immunology* 31: 743–91. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074929.
- Haniffa, Muzlifah, Amanda Shin, Venetia Bigley, Naomi McGovern, Pearline Teo, Peter See, Pavandip Singh Wasan, et al. 2012. "Human Tissues Contain CD141hi Cross-Presenting Dendritic Cells with Functional Homology to Mouse CD103+ Nonlymphoid Dendritic Cells." *Immunity* 37 (1): 60–73. doi:10.1016/j.immuni.2012.04.012.
- Hawiger, D., K. Inaba, Y. Dorsett, M. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, J. V. Ravetch, R. M. Steinman, and M. C. Nussenzweig. 2001. "Dendritic Cells Induce Peripheral T Cell Unresponsiveness under Steady State Conditions in Vivo." *The Journal of Experimental Medicine* 194 (6): 769–79.
- Hegazy, Ahmed N., Michael Peine, Caroline Helmstetter, Isabel Panse, Anja Fröhlich, Andreas Bergthaler, Lukas Flatz, Daniel D. Pinschewer, Andreas Radbruch, and Max Löhning. 2010. "Interferons Direct Th2 Cell Reprogramming to Generate a Stable GATA-3(+)T-Bet(+) Cell Subset with Combined Th2 and Th1 Cell Functions." *Immunity* 32 (1): 116–28. doi:10.1016/j.immuni.2009.12.004.
- Helft, Julie, Balaji Manicassamy, Pierre Gueronprez, Daigo Hashimoto, Aymeric Silvin, Judith Agudo, Brian D. Brown, et al. 2012. "Cross-Presenting CD103+ Dendritic Cells Are Protected from Influenza Virus Infection." *The Journal of Clinical Investigation* 122 (11): 4037–47. doi:10.1172/JCI60659.
- Henri, Sandrine, Lionel Franz Poulin, Samira Tamoutounour, Laurence Ardouin, Martin Guilliams, Béatrice de Bovis, Elisabeth Devilard, et al. 2010. "CD207+ CD103+ Dermal Dendritic Cells Cross-Present Keratinocyte-Derived Antigens Irrespective of the Presence of Langerhans Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 207 (1): 189–206. doi:10.1084/jem.20091964.
- Hernanz-Falcón, Patricia, Olivier Joffre, David L. Williams, and Caetano Reis e Sousa. 2009. "Internalization of Dectin-1 Terminates Induction of Inflammatory Responses." *European Journal of Immunology* 39 (2): 507–13. doi:10.1002/eji.200838687.
- Heslan, Jean Marie, Karine Renaudin, Pamela Thebault, Regis Josien, Maria-Cristina Cuturi, and Elise Chiffolleau. 2006. "New Evidence for a Role of Allograft Accommodation in Long-Term Tolerance." *Transplantation* 82 (9): 1185–93. doi:10.1097/01.tp.0000236573.01428.f3.
- Hildner, Kai, Brian T. Edelson, Whitney E. Purtha, Mark Diamond, Hirokazu Matsushita, Masako Kohyama, Boris Calderon, et al. 2008. "Batf3 Deficiency Reveals a Critical Role for CD8alpha+ Dendritic Cells in Cytotoxic T Cell Immunity." *Science (New York, N.Y.)* 322 (5904): 1097–1100. doi:10.1126/science.1164206.

- Hiltbold, E. M., M. D. Alter, P. Ciborowski, and O. J. Finn. 1999. "Presentation of MUC1 Tumor Antigen by Class I MHC and CTL Function Correlate with the Glycosylation State of the Protein Taken Up by Dendritic Cells." *Cellular Immunology* 194 (2): 143–49. doi:10.1006/cimm.1999.1512.
- Hiltbold, E. M., A. M. Vlad, P. Ciborowski, S. C. Watkins, and O. J. Finn. 2000. "The Mechanism of Unresponsiveness to Circulating Tumor Antigen MUC1 Is a Block in Intracellular Sorting and Processing by Dendritic Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 165 (7): 3730–41.
- Hochrein, H., K. Shortman, D. Vremec, B. Scott, P. Hertzog, and M. O’Keeffe. 2001. "Differential Production of IL-12, IFN-Alpha, and IFN-Gamma by Mouse Dendritic Cell Subsets." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 166 (9): 5448–55.
- Hodges, Ashleigh, Katherine Sharrocks, Mariola Edelmann, Dilair Baban, Arnaud Moris, Olivier Schwartz, Hal Drakesmith, et al. 2007a. "Activation of the Lectin DC-SIGN Induces an Immature Dendritic Cell Phenotype Triggering Rho-GTPase Activity Required for HIV-1 Replication." *Nature Immunology* 8 (6): 569–77. doi:10.1038/ni1470.
- Hovius, Joppe W. R., Marein A. W. P. de Jong, Jeroen den Dunnen, Manja Litjens, Erol Fikrig, Tom van der Poll, Sonja I. Gringhuis, and Teunis B. H. Geijtenbeek. 2008. "Salp15 Binding to DC-SIGN Inhibits Cytokine Expression by Impairing Both Nucleosome Remodeling and mRNA Stabilization." *PLoS Pathogens* 4 (2): e31. doi:10.1371/journal.ppat.0040031.
- Hsieh, Chyi-Song, Hyang-Mi Lee, and Chan-Wang J. Lio. 2012. "Selection of Regulatory T Cells in the Thymus." *Nature Reviews. Immunology* 12 (3): 157–67. doi:10.1038/nri3155.
- Huang, Xiaopei, and Yiping Yang. 2011a. "Targeting Co-Stimulatory Pathways in Gene Therapy." *Frontiers in Microbiology* 2: 202. doi:10.3389/fmicb.2011.00202.
- Hughes, Peter D., Gabrielle T. Belz, Karen A. Fortner, Ralph C. Budd, Andreas Strasser, and Philippe Bouillet. 2008. "Apoptosis Regulators Fas and Bim Cooperate in Shutdown of Chronic Immune Responses and Prevention of Autoimmunity." *Immunity* 28 (2): 197–205. doi:10.1016/j.immuni.2007.12.017.
- Hunger, Robert E., Peter A. Sieling, Maria Teresa Ochoa, Makoto Sugaya, Anne E. Burdick, Thomas H. Rea, Patrick J. Brennan, et al. 2004. "Langerhans Cells Utilize CD1a and Langerin to Efficiently Present Nonpeptide Antigens to T Cells." *The Journal of Clinical Investigation* 113 (5): 701–8. doi:10.1172/JCI19655.
- Hutcheson, Jack, John C. Scatizzi, Akbar M. Siddiqui, G. Kenneth Haines, Tianfu Wu, Quan-Zhen Li, Laurie S. Davis, Chandra Mohan, and Harris Perlman. 2008. "Combined Deficiency of Proapoptotic Regulators Bim and Fas Results in the Early Onset of Systemic Autoimmunity." *Immunity* 28 (2): 206–17. doi:10.1016/j.immuni.2007.12.015.
- Idoyaga, Juliana, Cheolho Cheong, Koji Suda, Nao Suda, Jae Y. Kim, Haekyung Lee, Chae Gyu Park, and Ralph M. Steinman. 2008. "Cutting Edge: Langerin/CD207 Receptor on Dendritic Cells Mediates Efficient Antigen Presentation on MHC I and II Products in Vivo." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 180 (6): 3647–50.
- Igyártó, Botond Z., Krystal Haley, Daniela Ortner, Aleh Bobr, Maryam Gerami-Nejad, Brian T. Edelson, Sandra M. Zurawski, et al. 2011. "Skin-Resident Murine Dendritic Cell Subsets Promote Distinct and Opposing Antigen-Specific T Helper Cell Responses." *Immunity* 35 (2): 260–72. doi:10.1016/j.immuni.2011.06.005.
- Irla, Magali, Natalia Küpfer, Tobias Suter, Rami Lissilaa, Mahdia Benkhoucha, Jonathan Skupsky, Patrice H. Lalive, Adriano Fontana, Walter Reith, and Stéphanie Hugues. 2010. "MHC Class II-Restricted Antigen Presentation by Plasmacytoid Dendritic Cells Inhibits T Cell-Mediated Autoimmunity." *The Journal of Experimental Medicine* 207 (9): 1891–1905. doi:10.1084/jem.20092627.
- Ishikawa, Eri, Tetsuaki Ishikawa, Yasu S. Morita, Kenji Toyonaga, Hisakata Yamada, Osamu Takeuchi, Taroh Kinoshita, Shizuo Akira, Yasunobu Yoshikai, and Sho Yamasaki. 2009.

- “Direct Recognition of the Mycobacterial Glycolipid, Trehalose Dimycolate, by C-Type Lectin Mincle.” *The Journal of Experimental Medicine* 206 (13): 2879–88. doi:10.1084/jem.20091750.
- Janeway, C. A. 1989. “Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology.” *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 54 Pt 1: 1–13.
- Jauregui-Amezaga, Aranzazu, Raquel Cabezón, Anna Ramírez-Morros, Carolina España, Jordi Rimola, Concepció Bru, Susana Pinó-Donnay, et al. 2015. “Intraperitoneal Administration of Autologous Tolerogenic Dendritic Cells for Refractory Crohn’s Disease: A Phase I Study.” *Journal of Crohn’s & Colitis* 9 (12): 1071–78. doi:10.1093/ecco-jcc/jjv144.
- Joffre, Olivier P., David Sancho, Santiago Zelenay, Anna M. Keller, and Caetano Reis e Sousa. 2010. “Efficient and Versatile Manipulation of the Peripheral CD4+ T-Cell Compartment by Antigen Targeting to DNGR-1/CLEC9A.” *European Journal of Immunology* 40 (5): 1255–65. doi:10.1002/eji.201040419.
- Joffre, Olivier P., Elodie Segura, Ariel Savina, and Sebastian Amigorena. 2012. “Cross-Presentation by Dendritic Cells.” *Nature Reviews. Immunology* 12 (8): 557–69. doi:10.1038/nri3254.
- Joo, HyeMee, Katherine Upchurch, Wei Zhang, Ling Ni, Dapeng Li, Yaming Xue, Xiao-Hua Li, et al. 2015. “Opposing Roles of Dectin-1 Expressed on Human Plasmacytoid Dendritic Cells and Myeloid Dendritic Cells in Th2 Polarization.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 195 (4): 1723–31. doi:10.4049/jimmunol.1402276.
- Jovanovic, Vojislav, Anne-Sophie Dugast, Jean-Marie Heslan, Joanna Ashton-Chess, Magali Giral, Nicolas Degauque, Anne Moreau, et al. 2008. “Implication of Matrix Metalloproteinase 7 and the Noncanonical Wingless-Type Signaling Pathway in a Model of Kidney Allograft Tolerance Induced by the Administration of Anti-Donor Class II Antibodies.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 180 (3): 1317–25.
- June, C. H., J. A. Ledbetter, P. S. Linsley, and C. B. Thompson. 1990. “Role of the CD28 Receptor in T-Cell Activation.” *Immunology Today* 11 (6): 211–16.
- Kägi, D., B. Ledermann, K. Bürki, P. Seiler, B. Odermatt, K. J. Olsen, E. R. Podack, R. M. Zinkernagel, and H. Hengartner. 1994. “Cytotoxicity Mediated by T Cells and Natural Killer Cells Is Greatly Impaired in Perforin-Deficient Mice.” *Nature* 369 (6475): 31–37. doi:10.1038/369031a0.
- Kanazawa, Nobuo, Taku Okazaki, Hiroyuki Nishimura, Kei Tashiro, Kayo Inaba, and Yoshiki Miyachi. 2002. “DCIR Acts as an Inhibitory Receptor Depending on Its Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory Motif.” *The Journal of Investigative Dermatology* 118 (2): 261–66. doi:10.1046/j.0022-202x.2001.01633.x.
- Kastenmüller, Kathrin, Ulrike Wille-Reece, Ross W. B. Lindsay, Lauren R. Trager, Patricia A. Darrah, Barbara J. Flynn, Maria R. Becker, et al. 2011. “Protective T Cell Immunity in Mice Following Protein-TLR7/8 Agonist-Conjugate Immunization Requires Aggregation, Type I IFN, and Multiple DC Subsets.” *The Journal of Clinical Investigation* 121 (5): 1782–96. doi:10.1172/JCI45416.
- Kataoka, H., N. Kume, S. Miyamoto, M. Minami, T. Murase, T. Sawamura, T. Masaki, N. Hashimoto, and T. Kita. 2000. “Biosynthesis and Post-Translational Processing of Lectin-like Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor-1 (LOX-1). N-Linked Glycosylation Affects Cell-Surface Expression and Ligand Binding.” *The Journal of Biological Chemistry* 275 (9): 6573–79.
- Kato, Yu, Ali Zaid, Gayle M. Davey, Scott N. Mueller, Stephen L. Nutt, Dimitra Zotos, David M. Tarlinton, et al. 2015. “Targeting Antigen to Clec9A Primes Follicular Th Cell Memory Responses Capable of Robust Recall.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 195 (3): 1006–14. doi:10.4049/jimmunol.1500767.

- Kawai, Taro, Ken Takahashi, Shintaro Sato, Cevayir Coban, Himanshu Kumar, Hiroki Kato, Ken J. Ishii, Osamu Takeuchi, and Shizuo Akira. 2005. "IPS-1, an Adaptor Triggering RIG-I- and Mda5-Mediated Type I Interferon Induction." *Nature Immunology* 6 (10): 981–88. doi:10.1038/ni1243.
- Kim, Taeg S., and Thomas J. Braciale. 2009. "Respiratory Dendritic Cell Subsets Differ in Their Capacity to Support the Induction of Virus-Specific Cytotoxic CD8+ T Cell Responses." *PLoS One* 4 (1): e4204. doi:10.1371/journal.pone.0004204.
- King, Irah L., Mark A. Kroenke, and Benjamin M. Segal. 2010. "GM-CSF-Dependent, CD103+ Dermal Dendritic Cells Play a Critical Role in Th Effector Cell Differentiation after Subcutaneous Immunization." *The Journal of Experimental Medicine* 207 (5): 953–61. doi:10.1084/jem.20091844.
- Klechevsky, Eynav, Anne-Laure Flamar, Yanying Cao, Jean-Philippe Blanck, Maochang Liu, Amy O'Bar, Olivier Agouna-Deciat, et al. 2010. "Cross-Priming CD8+ T Cells by Targeting Antigens to Human Dendritic Cells through DCIR." *Blood* 116 (10): 1685–97. doi:10.1182/blood-2010-01-264960.
- Kleijwegt, Fleur S., Sandra Laban, Gaby Duinkerken, Antoinette M. Joosten, Bobby P. C. Koeleman, Tatjana Nikolic, and Bart O. Roep. 2011. "Transfer of Regulatory Properties from Tolerogenic to Proinflammatory Dendritic Cells via Induced Autoreactive Regulatory T Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 187 (12): 6357–64. doi:10.4049/jimmunol.1101638.
- Koble, Christian, and Bruno Kyewski. 2009. "The Thymic Medulla: A Unique Microenvironment for Intercellular Self-Antigen Transfer." *The Journal of Experimental Medicine* 206 (7): 1505–13. doi:10.1084/jem.20082449.
- Kumar, Himanshu, Taro Kawai, and Shizuo Akira. 2011. "Pathogen Recognition by the Innate Immune System." *International Reviews of Immunology* 30 (1): 16–34. doi:10.3109/08830185.2010.529976.
- Lafferty, K. J., L. Andrus, and S. J. Prowse. 1980. "Role of Lymphokine and Antigen in the Control of Specific T Cell Responses." *Immunological Reviews* 51: 279–314.
- Lai, Wai K., Phoebe J. Sun, Jie Zhang, Adam Jennings, Patricia F. Lalor, Stefan Hubscher, Jane A. McKeating, and David H. Adams. 2006. "Expression of DC-SIGN and DC-SIGNR on Human Sinusoidal Endothelium: A Role for Capturing Hepatitis C Virus Particles." *The American Journal of Pathology* 169 (1): 200–208. doi:10.2353/ajpath.2006.051191.
- Lambert, Alexandra A., Frédéric Barabé, Caroline Gilbert, and Michel J. Tremblay. 2011. "DCIR-Mediated Enhancement of HIV-1 Infection Requires the ITIM-Associated Signal Transduction Pathway." *Blood* 117 (24): 6589–99. doi:10.1182/blood-2011-01-331363.
- Lambert, Alexandra A., Caroline Gilbert, Manon Richard, André D. Beaulieu, and Michel J. Tremblay. 2008. "The C-Type Lectin Surface Receptor DCIR Acts as a New Attachment Factor for HIV-1 in Dendritic Cells and Contributes to Trans- and Cis-Infection Pathways." *Blood* 112 (4): 1299–1307. doi:10.1182/blood-2008-01-136473.
- Langlet, Christelle, Samira Tamoutounour, Sandrine Henri, Hervé Luche, Laurence Ardouin, Claude Grégoire, Bernard Malissen, and Martin Williams. 2012. "CD64 Expression Distinguishes Monocyte-Derived and Conventional Dendritic Cells and Reveals Their Distinct Role during Intramuscular Immunization." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 188 (4): 1751–60. doi:10.4049/jimmunol.1102744.
- Le Gros, G., S. Z. Ben-Sasson, R. Seder, F. D. Finkelman, and W. E. Paul. 1990. "Generation of Interleukin 4 (IL-4)-Producing Cells in Vivo and in Vitro: IL-2 and IL-4 Are Required for in Vitro Generation of IL-4-Producing Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 172 (3): 921–29.
- Lechler, R. I., and J. R. Batchelor. 1982. "Restoration of Immunogenicity to Passenger Cell-Depleted Kidney Allografts by the Addition of Donor Strain Dendritic Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 155 (1): 31–41.

- Lee, Hyang Mi, and Chyi-Song Hsieh. 2009. "Rare Development of Foxp3+ Thymocytes in the CD4+CD8+ Subset." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183 (4): 2261–66. doi:10.4049/jimmunol.0901304.
- Lee, Yun Kyung, Henrietta Turner, Craig L. Maynard, James R. Oliver, Dongquan Chen, Charles O. Elson, and Casey T. Weaver. 2009. "Late Developmental Plasticity in the T Helper 17 Lineage." *Immunity* 30 (1): 92–107. doi:10.1016/j.immuni.2008.11.005.
- LeibundGut-Landmann, Salomé, Olaf Gross, Matthew J. Robinson, Fabiola Osorio, Emma C. Slack, S. Vicky Tsoni, Edina Schweighoffer, et al. 2007. "Syk- and CARD9-Dependent Coupling of Innate Immunity to the Induction of T Helper Cells That Produce Interleukin 17." *Nature Immunology* 8 (6): 630–38. doi:10.1038/ni1460.
- Leibundgut-Landmann, Salomé, Fabiola Osorio, Gordon D. Brown, and Caetano Reis e Sousa. 2008. "Stimulation of Dendritic Cells via the Dectin-1/Syk Pathway Allows Priming of Cytotoxic T-Cell Responses." *Blood* 112 (13): 4971–80. doi:10.1182/blood-2008-05-158469.
- Lenz, A., M. Heine, G. Schuler, and N. Romani. 1993. "Human and Murine Dermis Contain Dendritic Cells. Isolation by Means of a Novel Method and Phenotypical and Functional Characterization." *The Journal of Clinical Investigation* 92 (6): 2587–96. doi:10.1172/JCI116873.
- Leulier, François, and Bruno Lemaitre. 2008. "Toll-like Receptors--Taking an Evolutionary Approach." *Nature Reviews. Genetics* 9 (3): 165–78. doi:10.1038/nrg2303.
- Leung, Daisy W., Christopher F. Basler, and Gaya K. Amarasinghe. 2012. "Molecular Mechanisms of Viral Inhibitors of RIG-I-like Receptors." *Trends in Microbiology* 20 (3): 139–46. doi:10.1016/j.tim.2011.12.005.
- Lewis, Kanako L., Michele L. Caton, Milena Bogunovic, Melanie Greter, Lucja T. Grajkowska, Dennis Ng, Apostolos Klinakis, et al. 2011a. "Notch2 Receptor Signaling Controls Functional Differentiation of Dendritic Cells in the Spleen and Intestine." *Immunity* 35 (5): 780–91. doi:10.1016/j.immuni.2011.08.013.
- Libby, P., and J. S. Pober. 2001. "Chronic Rejection." *Immunity* 14 (4): 387–97.
- Lio, Chan-Wang Joaquim, and Chyi-Song Hsieh. 2008. "A Two-Step Process for Thymic Regulatory T Cell Development." *Immunity* 28 (1): 100–111. doi:10.1016/j.immuni.2007.11.021.
- Liston, Adrian, Katherine M. Nutsch, Andrew G. Farr, Jennifer M. Lund, Jeffery P. Rasmussen, Pandelakis A. Koni, and Alexander Y. Rudensky. 2008. "Differentiation of Regulatory Foxp3+ T Cells in the Thymic Cortex." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (33): 11903–8. doi:10.1073/pnas.0801506105.
- Lobato-Pascual, Ana, Per Christian Saether, Sigbjørn Fossum, Erik Dissen, and Michael R. Daws. 2013. "Mincle, the Receptor for Mycobacterial Cord Factor, Forms a Functional Receptor Complex with MCL and FcεRI-γ." *European Journal of Immunology* 43 (12): 3167–74. doi:10.1002/eji.201343752.
- Lundberg, Kristina, Frida Rydnert, Lennart Greiff, and Malin Lindstedt. 2014. "Human Blood Dendritic Cell Subsets Exhibit Discriminative Pattern Recognition Receptor Profiles." *Immunology* 142 (2): 279–88. doi:10.1111/imm.12252.
- Lutz, M. B., R. M. Suri, M. Niimi, A. L. Ogilvie, N. A. Kukutsch, S. Rössner, G. Schuler, and J. M. Austyn. 2000. "Immature Dendritic Cells Generated with Low Doses of GM-CSF in the Absence of IL-4 Are Maturation Resistant and Prolong Allograft Survival in Vivo." *European Journal of Immunology* 30 (7): 1813–22. doi:10.1002/1521-4141(200007)30:7<1813::AID-IMMU1813>3.0.CO;2-8.
- Machen, Jennifer, Jo Harnaha, Robert Lakomy, Alexis Styche, Massimo Trucco, and Nick Giannoukakis. 2004. "Antisense Oligonucleotides down-Regulating Costimulation Confer Diabetes-Preventive Properties to Nonobese Diabetic Mouse Dendritic Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 173 (7): 4331–41.

- Mahnke, Karsten, Yingjie Qian, Jürgen Knop, and Alexander H. Enk. 2003. "Induction of CD4+/CD25+ Regulatory T Cells by Targeting of Antigens to Immature Dendritic Cells." *Blood* 101 (12): 4862–69. doi:10.1182/blood-2002-10-3229.
- Maldonado-López, R., T. De Smedt, P. Michel, J. Godfroid, B. Pajak, C. Heirman, K. Thielemans, O. Leo, J. Urbain, and M. Moser. 1999. "CD8alpha+ and CD8alpha- Subclasses of Dendritic Cells Direct the Development of Distinct T Helper Cells in Vivo." *The Journal of Experimental Medicine* 189 (3): 587–92.
- Mangan, Paul R., Laurie E. Harrington, Darrell B. O'Quinn, Whitney S. Helms, Daniel C. Bullard, Charles O. Elson, Robin D. Hatton, Sharon M. Wahl, Trenton R. Schoeb, and Casey T. Weaver. 2006. "Transforming Growth Factor-Beta Induces Development of the T(H)17 Lineage." *Nature* 441 (7090): 231–34. doi:10.1038/nature04754.
- Martin, Bruno, Keiji Hirota, Daniel J. Cua, Brigitta Stockinger, and Marc Veldhoen. 2009. "Interleukin-17-Producing Gammadelta T Cells Selectively Expand in Response to Pathogen Products and Environmental Signals." *Immunity* 31 (2): 321–30. doi:10.1016/j.immuni.2009.06.020.
- Martín-Gayo, Enrique, Elena Sierra-Filardi, Angel L. Corbí, and María L. Toribio. 2010. "Plasmacytoid Dendritic Cells Resident in Human Thymus Drive Natural Treg Cell Development." *Blood* 115 (26): 5366–75. doi:10.1182/blood-2009-10-248260.
- Mashayekhi, Mona, Michelle M. Sandau, Ildiko R. Dunay, Eva M. Frickel, Asis Khan, Romina S. Goldszmid, Alan Sher, et al. 2011. "CD8α(+) Dendritic Cells Are the Critical Source of Interleukin-12 That Controls Acute Infection by *Toxoplasma Gondii* Tachyzoites." *Immunity* 35 (2): 249–59. doi:10.1016/j.immuni.2011.08.008.
- Mattei, F., G. Schiavoni, F. Belardelli, and D. F. Tough. 2001. "IL-15 Is Expressed by Dendritic Cells in Response to Type I IFN, Double-Stranded RNA, or Lipopolysaccharide and Promotes Dendritic Cell Activation." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 167 (3): 1179–87.
- McIlroy, D., C. Troadec, F. Grassi, A. Samri, B. Barrou, B. Autran, P. Debré, J. Feuillard, and A. Hosmalin. 2001. "Investigation of Human Spleen Dendritic Cell Phenotype and Distribution Reveals Evidence of in Vivo Activation in a Subset of Organ Donors." *Blood* 97 (11): 3470–77.
- McLachlan, James B., Drew M. Catron, James J. Moon, and Marc K. Jenkins. 2009a. "Dendritic Cell Antigen Presentation Drives Simultaneous Cytokine Production by Effector and Regulatory T Cells in Inflamed Skin." *Immunity* 30 (2): 277–88. doi:10.1016/j.immuni.2008.11.013.
- Mellman, I., and R. M. Steinman. 2001. "Dendritic Cells: Specialized and Regulated Antigen Processing Machines." *Cell* 106 (3): 255–58.
- Mellman, Ira. 2013. "Dendritic Cells: Master Regulators of the Immune Response." *Cancer Immunology Research* 1 (3): 145–49. doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0102.
- Merad, Miriam, Florent Ginhoux, and Matthew Collin. 2008. "Origin, Homeostasis and Function of Langerhans Cells and Other Langerin-Expressing Dendritic Cells." *Nature Reviews. Immunology* 8 (12): 935–47. doi:10.1038/nri2455.
- Merad, Miriam, Priyanka Sathe, Julie Helft, Jennifer Miller, and Arthur Mortha. 2013a. "The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting." *Annual Review of Immunology* 31: 563–604. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074950.
- Meyer-Wentrup, Friederike, Daniel Benitez-Ribas, Paul J. Tacken, Cornelis J. A. Punt, Carl G. Figdor, I. Jolanda M. de Vries, and Gosse J. Adema. 2008. "Targeting DCIR on Human Plasmacytoid Dendritic Cells Results in Antigen Presentation and Inhibits IFN-Alpha Production." *Blood* 111 (8): 4245–53. doi:10.1182/blood-2007-03-081398.
- Meyer-Wentrup, Friederike, Alessandra Cambi, Ben Joosten, Maaïke W. Looman, I. Jolanda M. de Vries, Carl G. Figdor, and Gosse J. Adema. 2009a. "DCIR Is Endocytosed into Human

- Dendritic Cells and Inhibits TLR8-Mediated Cytokine Production." *Journal of Leukocyte Biology* 85 (3): 518–25. doi:10.1189/jlb.0608352.
- Minami, M., N. Kume, H. Kataoka, M. Morimoto, K. Hayashida, T. Sawamura, T. Masaki, and T. Kita. 2000. "Transforming Growth Factor-beta(1) Increases the Expression of Lectin-like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 272 (2): 357–61. doi:10.1006/bbrc.2000.2778.
- Miyaji, E. N., E. Carvalho, M. L. S. Oliveira, I. Raw, and P. L. Ho. 2011. "Trends in Adjuvant Development for Vaccines: DAMPs and PAMPs as Potential New Adjuvants." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas* 44 (6): 500–513.
- Moreau, Aurélie, Brigitte Alliot-Licht, Maria-Cristina Cuturi, and Gilles Blancho. 2016. "Tolerogenic Dendritic Cell Therapy in Organ Transplantation." *Transplant International: Official Journal of the European Society for Organ Transplantation*, November. doi:10.1111/tri.12889.
- Mori, Daiki, Kensuke Shibata, and Sho Yamasaki. 2017. "C-Type Lectin Receptor Dectin-2 Binds to an Endogenous Protein β -Glucuronidase on Dendritic Cells." *PloS One* 12 (1): e0169562. doi:10.1371/journal.pone.0169562.
- Moseman, E. Ashley, Xueqing Liang, Amanda J. Dawson, Angela Panoskaltis-Mortari, Arthur M. Krieg, Yong-Jun Liu, Bruce R. Blazar, and Wei Chen. 2004. "Human Plasmacytoid Dendritic Cells Activated by CpG Oligodeoxynucleotides Induce the Generation of CD4+CD25+ Regulatory T Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 173 (7): 4433–42.
- Murphy, Kenneth M., and Steven L. Reiner. 2002. "The Lineage Decisions of Helper T Cells." *Nature Reviews. Immunology* 2 (12): 933–44. doi:10.1038/nri954.
- Nestle, F. O., X. G. Zheng, C. B. Thompson, L. A. Turka, and B. J. Nickoloff. 1993. "Characterization of Dermal Dendritic Cells Obtained from Normal Human Skin Reveals Phenotypic and Functionally Distinctive Subsets." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 151 (11): 6535–45.
- Nikolic, Tatjana, and Bart O. Roep. 2013. "Regulatory Multitasking of Tolerogenic Dendritic Cells - Lessons Taken from Vitamin d3-Treated Tolerogenic Dendritic Cells." *Frontiers in Immunology* 4: 113. doi:10.3389/fimmu.2013.00113.
- Nurieva, Roza I., Yeonseok Chung, Gustavo J. Martinez, Xuexian O. Yang, Shinya Tanaka, Tatyana D. Matskevitch, Yi-Hong Wang, and Chen Dong. 2009. "Bcl6 Mediates the Development of T Follicular Helper Cells." *Science (New York, N.Y.)* 325 (5943): 1001–5. doi:10.1126/science.1176676.
- Nurieva, Roza I., Xikui Liu, and Chen Dong. 2009. "Yin-Yang of Costimulation: Crucial Controls of Immune Tolerance and Function." *Immunological Reviews* 229 (1): 88–100. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00769.x.
- Nurieva, Roza, Xuexian O. Yang, Gustavo Martinez, Yongliang Zhang, Athanasia D. Panopoulos, Li Ma, Kimberly Schluns, et al. 2007. "Essential Autocrine Regulation by IL-21 in the Generation of Inflammatory T Cells." *Nature* 448 (7152): 480–83. doi:10.1038/nature05969.
- Ochando, J. C., N. R. Krieger, and J. S. Bromberg. 2006. "Direct versus Indirect Allorecognition: Visualization of Dendritic Cell Distribution and Interactions during Rejection and Tolerization." *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 6 (10): 2488–96. doi:10.1111/j.1600-6143.2006.01494.x.
- Ochando, Jordi C., Chiho Homma, Yu Yang, Andres Hidalgo, Alexandre Garin, Frank Tacke, Veronique Angeli, et al. 2006. "Alloantigen-Presenting Plasmacytoid Dendritic Cells Mediate Tolerance to Vascularized Grafts." *Nature Immunology* 7 (6): 652–62. doi:10.1038/ni1333.

- Ohl, Lars, Mariette Mohaupt, Niklas Czeloth, Gabriele Hintzen, Ziba Kiafard, Jörg Zwirner, Thomas Blankenstein, Golo Henning, and Reinhold Förster. 2004. "CCR7 Governs Skin Dendritic Cell Migration under Inflammatory and Steady-State Conditions." *Immunity* 21 (2): 279–88. doi:10.1016/j.immuni.2004.06.014.
- Olynych, Timothy J., David L. Jakeman, and Jean S. Marshall. 2006. "Fungal Zymosan Induces Leukotriene Production by Human Mast Cells through a Dectin-1-Dependent Mechanism." *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 118 (4): 837–43. doi:10.1016/j.jaci.2006.06.008.
- Palma, Angelina S., Ten Feizi, Yibing Zhang, Mark S. Stoll, Alexander M. Lawson, Esther Díaz-Rodríguez, María Asunción Campanero-Rhodes, et al. 2006. "Ligands for the Beta-Glucan Receptor, Dectin-1, Assigned Using 'designer' microarrays of Oligosaccharide Probes (Neoglycolipids) Generated from Glucan Polysaccharides." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (9): 5771–79. doi:10.1074/jbc.M511461200.
- Passlick, B., D. Flieger, and H. W. Ziegler-Heitbrock. 1989. "Identification and Characterization of a Novel Monocyte Subpopulation in Human Peripheral Blood." *Blood* 74 (7): 2527–34.
- Pêche, Hélène, Benjamin Trinité, Bernard Martinet, and Maria Cristina Cuturi. 2005. "Prolongation of Heart Allograft Survival by Immature Dendritic Cells Generated from Recipient Type Bone Marrow Progenitors." *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 5 (2): 255–67. doi:10.1111/j.1600-6143.2004.00683.x.
- Penna, G., and L. Adorini. 2000. "1 Alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 Inhibits Differentiation, Maturation, Activation, and Survival of Dendritic Cells Leading to Impaired Alloreactive T Cell Activation." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 164 (5): 2405–11.
- Perdicchio, Maurizio, Lenneke A. M. Cornelissen, Ingeborg Streng-Ouwehand, Steef Engels, Marleen I. Verstege, Louis Boon, Dirk Geerts, Yvette van Kooyk, and Wendy W. J. Unger. 2016. "Tumor Sialylation Impedes T Cell Mediated Anti-Tumor Responses While Promoting Tumor Associated-Regulatory T Cells." *Oncotarget* 7 (8): 8771–82. doi:10.18632/oncotarget.6822.
- Piccioli, Diego, Simona Tavarini, Erica Borgogni, Veronica Steri, Sandra Nuti, Chiara Sammiceli, Monia Bardelli, Daniela Montagna, Franco Locatelli, and Andreas Wack. 2007. "Functional Specialization of Human Circulating CD16 and CD1c Myeloid Dendritic-Cell Subsets." *Blood* 109 (12): 5371–79. doi:10.1182/blood-2006-08-038422.
- Plato, Anthony, Janet A. Willment, and Gordon D. Brown. 2013. "C-Type Lectin-like Receptors of the Dectin-1 Cluster: Ligands and Signaling Pathways." *International Reviews of Immunology* 32 (2): 134–56. doi:10.3109/08830185.2013.777065.
- Poulin, Lionel F., Yasmin Reyat, Heli Uronen-Hansson, Barbara U. Schraml, David Sancho, Kenneth M. Murphy, Ulf K. Håkansson, et al. 2012. "DNGR-1 Is a Specific and Universal Marker of Mouse and Human Batf3-Dependent Dendritic Cells in Lymphoid and Nonlymphoid Tissues." *Blood* 119 (25): 6052–62. doi:10.1182/blood-2012-01-406967.
- Poulin, Lionel Franz, Mariolina Salio, Emmanuel Griessinger, Fernando Anjos-Afonso, Ligia Craciun, Ji-Li Chen, Anna M. Keller, et al. 2010. "Characterization of Human DNGR-1+ BDCA3+ Leukocytes as Putative Equivalents of Mouse CD8alpha+ Dendritic Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 207 (6): 1261–71. doi:10.1084/jem.20092618.
- Pratt, Julian R., Shamim A. Basheer, and Steven H. Sacks. 2002. "Local Synthesis of Complement Component C3 Regulates Acute Renal Transplant Rejection." *Nature Medicine* 8 (6): 582–87. doi:10.1038/nm0602-582.
- Probst, Hans Christian, Kathy McCoy, Taku Okazaki, Tasuku Honjo, and Maries van den Broek. 2005. "Resting Dendritic Cells Induce Peripheral CD8+ T Cell Tolerance through PD-1 and CTLA-4." *Nature Immunology* 6 (3): 280–86. doi:10.1038/ni1165.

- Proietto, Anna I., Serani van Dommelen, Penghui Zhou, Alexandra Rizzitelli, Angela D'Amico, Raymond J. Steptoe, Shalin H. Naik, et al. 2008. "Dendritic Cells in the Thymus Contribute to T-Regulatory Cell Induction." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (50): 19869–74. doi:10.1073/pnas.0810268105.
- Pulendran, Bali, Jason Z. Oh, Helder I. Nakaya, Rajesh Ravindran, and Dmitri A. Kazmin. 2013. "Immunity to Viruses: Learning from Successful Human Vaccines." *Immunological Reviews* 255 (1): 243–55. doi:10.1111/imr.12099.
- Randolph, Gwendalyn J., Veronique Angeli, and Melody A. Swartz. 2005. "Dendritic-Cell Trafficking to Lymph Nodes through Lymphatic Vessels." *Nature Reviews. Immunology* 5 (8): 617–28. doi:10.1038/nri1670.
- Randolph, Gwendalyn J., Jordi Ochando, and Santiago Partida-Sánchez. 2008. "Migration of Dendritic Cell Subsets and Their Precursors." *Annual Review of Immunology* 26: 293–316. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090254.
- Reis e Sousa, Caetano. 2006. "Dendritic Cells in a Mature Age." *Nature Reviews. Immunology* 6 (6): 476–83. doi:10.1038/nri1845.
- Ridge, J. P., F. Di Rosa, and P. Matzinger. 1998. "A Conditioned Dendritic Cell Can Be a Temporal Bridge between a CD4+ T-Helper and a T-Killer Cell." *Nature* 393 (6684): 474–78. doi:10.1038/30989.
- Rivera, Amariliz, Tobias M. Hohl, Nichole Collins, Ingrid Leiner, Alena Gallegos, Shinobu Saijo, Jesse W. Coward, Yoichiro Iwakura, and Eric G. Pamer. 2011. "Dectin-1 Diversifies *Aspergillus Fumigatus*-Specific T Cell Responses by Inhibiting T Helper Type 1 CD4 T Cell Differentiation." *The Journal of Experimental Medicine* 208 (2): 369–81. doi:10.1084/jem.20100906.
- Rosas, Marcela, Kate Liddiard, Matti Kimberg, Inês Faro-Trindade, Jacqueline U. McDonald, David L. Williams, Gordon D. Brown, and Philip R. Taylor. 2008. "The Induction of Inflammation by Dectin-1 in Vivo Is Dependent on Myeloid Cell Programming and the Progression of Phagocytosis." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181 (5): 3549–57.
- Rossol, Manuela, Stephan Kraus, Matthias Pierer, Christoph Baerwald, and Ulf Wagner. 2012. "The CD14(bright) CD16+ Monocyte Subset Is Expanded in Rheumatoid Arthritis and Promotes Expansion of the Th17 Cell Population." *Arthritis and Rheumatism* 64 (3): 671–77. doi:10.1002/art.33418.
- Rubino, Stephen J., Thirumahal Selvanantham, Stephen E. Girardin, and Dana J. Philpott. 2012. "Nod-like Receptors in the Control of Intestinal Inflammation." *Current Opinion in Immunology* 24 (4): 398–404. doi:10.1016/j.coi.2012.04.010.
- Rudd, Christopher E., Alison Taylor, and Helga Schneider. 2009. "CD28 and CTLA-4 Coreceptor Expression and Signal Transduction." *Immunological Reviews* 229 (1): 12–26. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00770.x.
- Russ, Brendan E., Julia E. Prier, Sudha Rao, and Stephen J. Turner. 2013. "T Cell Immunity as a Tool for Studying Epigenetic Regulation of Cellular Differentiation." *Frontiers in Genetics* 4: 218. doi:10.3389/fgene.2013.00218.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. "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." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 155 (3): 1151–64.
- Salomon, B., D. J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe, and J. A. Bluestone. 2000a. "B7/CD28 Costimulation Is Essential for the Homeostasis of the CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells That Control Autoimmune Diabetes." *Immunity* 12 (4): 431–40.

- Sancho, David, and Caetano Reis e Sousa. 2012. "Signaling by Myeloid C-Type Lectin Receptors in Immunity and Homeostasis." *Annual Review of Immunology* 30: 491–529. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101352.
- Sattler, S., D. Reiche, C. Sturtzel, I. Karas, S. Richter, M. L. Kalb, W. Gregor, and E. Hofer. 2012. "The Human C-Type Lectin-like Receptor CLEC-1 Is Upregulated by TGF- β and Primarily Localized in the Endoplasmic Membrane Compartment." *Scandinavian Journal of Immunology* 75 (3): 282–92. doi:10.1111/j.1365-3083.2011.02665.x.
- Savina, Ariel, Audrey Peres, Ignacio Cebrian, Nuno Carmo, Catarina Moita, Nir Hacohen, Luis F. Moita, and Sebastian Amigorena. 2009. "The Small GTPase Rac2 Controls Phagosomal Alkalinization and Antigen Crosspresentation Selectively in CD8(+) Dendritic Cells." *Immunity* 30 (4): 544–55. doi:10.1016/j.immuni.2009.01.013.
- Sayegh, Mohamed H., and Robert B. Colvin. 2003. "Case Record of the Massachusetts General Hospital. Weekly Clinicopathological Exercises. Case 8-2003. A 35-Year-Old Man with Early Dysfunction of a Second Renal Transplant." *The New England Journal of Medicine* 348 (11): 1033–44. doi:10.1056/NEJMcpc020033.
- Schneider, Monika, Albert G. Zimmermann, Reid A. Roberts, Lu Zhang, Karen V. Swanson, Haitao Wen, Beckley K. Davis, et al. 2012. "The Innate Immune Sensor NLRC3 Attenuates Toll-like Receptor Signaling via Modification of the Signaling Adaptor TRAF6 and Transcription Factor NF- κ B." *Nature Immunology* 13 (9): 823–31. doi:10.1038/ni.2378.
- Schoenen, Hanne, Barbara Bodendorfer, Kelly Hitchens, Silvia Manzanero, Kerstin Werninghaus, Falk Nimmerjahn, Else Marie Agger, et al. 2010. "Cutting Edge: Mincle Is Essential for Recognition and Adjuvanticity of the Mycobacterial Cord Factor and Its Synthetic Analog Trehalose-Dibehenate." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 184 (6): 2756–60. doi:10.4049/jimmunol.0904013.
- Schulz, Olga, Elin Jaensson, Emma K. Persson, Xiaosun Liu, Tim Worbs, William W. Agace, and Oliver Pabst. 2009. "Intestinal CD103+, but Not CX3CR1+, Antigen Sampling Cells Migrate in Lymph and Serve Classical Dendritic Cell Functions." *The Journal of Experimental Medicine* 206 (13): 3101–14. doi:10.1084/jem.20091925.
- Schweneker, Katrin, Oliver Gorka, Marc Schweneker, Hendrik Poeck, Jürg Tschopp, Christian Peschel, Jürgen Ruland, and Olaf Gross. 2013. "The Mycobacterial Cord Factor Adjuvant Analogue Trehalose-6,6'-dibehenate (TDB) Activates the Nlrp3 Inflammasome." *Immunobiology* 218 (4): 664–73. doi:10.1016/j.imbio.2012.07.029.
- Segura, Elodie, Jenny Valladeau-Guilemond, Marie-Hélène Donnadieu, Xavier Sastre-Garau, Vassili Soumelis, and Sebastian Amigorena. 2012. "Characterization of Resident and Migratory Dendritic Cells in Human Lymph Nodes." *The Journal of Experimental Medicine* 209 (4): 653–60. doi:10.1084/jem.20111457.
- Seifert, Lena, Gregor Werba, Shaun Tiwari, Nancy Ngoc Giao Ly, Sara Alothman, Dalia Alqunaibit, Antonina Avanzi, et al. 2016. "The Necrosome Promotes Pancreatic Oncogenesis via CXCL1 and Mincle-Induced Immune Suppression." *Nature* 532 (7598): 245–49. doi:10.1038/nature17403.
- Seno, Akimasa, Takumi Maruhashi, Tomonori Kaifu, Rikio Yabe, Noriyuki Fujikado, Guangyu Ma, Tetsuro Ikarashi, Shigeru Kakuta, and Yoichiro Iwakura. 2015. "Exacerbation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice Deficient for DCIR, an Inhibitory C-Type Lectin Receptor." *Experimental Animals* 64 (2): 109–19.
- Seong, Seung-Yong, and Polly Matzinger. 2004. "Hydrophobicity: An Ancient Damage-Associated Molecular Pattern That Initiates Innate Immune Responses." *Nature Reviews. Immunology* 4 (6): 469–78. doi:10.1038/nri1372.
- Shortman, Ken, and Yong-Jun Liu. 2002. "Mouse and Human Dendritic Cell Subtypes." *Nature Reviews. Immunology* 2 (3): 151–61. doi:10.1038/nri746.

- Sobanov, Y., A. Bernreiter, S. Derdak, D. Mechtcheriakova, B. Schweighofer, M. Döchler, F. Kalthoff, and E. Hofer. 2001a. "A Novel Cluster of Lectin-like Receptor Genes Expressed in Monocytic, Dendritic and Endothelial Cells Maps close to the NK Receptor Genes in the Human NK Gene Complex." *European Journal of Immunology* 31 (12): 3493–3503. doi:10.1002/1521-4141(200112)31:12<3493::AID-IMMU3493>3.0.CO;2-9.
- Steinman, R. M., and Z. A. Cohn. 1973. "Identification of a Novel Cell Type in Peripheral Lymphoid Organs of Mice. I. Morphology, Quantitation, Tissue Distribution." *The Journal of Experimental Medicine* 137 (5): 1142–62.
- Stoppelkamp, Sandra, Delyth M. Reid, Joyce Yeoh, Julie Taylor, Emma J. McKenzie, Gordon D. Brown, Siamon Gordon, John V. Forrester, and Simon Y. C. Wong. 2015. "Murine Pattern Recognition Receptor Dectin-1 Is Essential in the Development of Experimental Autoimmune Uveoretinitis." *Molecular Immunology* 67 (2 Pt B): 398–406. doi:10.1016/j.molimm.2015.07.002.
- Streeck, Hendrik, M. Patricia D'Souza, Dan R. Littman, and Shane Crotty. 2013. "Harnessing CD4⁺ T Cell Responses in HIV Vaccine Development." *Nature Medicine* 19 (2): 143–49. doi:10.1038/nm.3054.
- Strober, Warren, Peter J. Murray, Atsushi Kitani, and Tomohiro Watanabe. 2006. "Signalling Pathways and Molecular Interactions of NOD1 and NOD2." *Nature Reviews Immunology* 6 (1): 9–20. doi:10.1038/nri1747.
- Swain, S. L., A. D. Weinberg, M. English, and G. Huston. 1990. "IL-4 Directs the Development of Th2-like Helper Effectors." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 145 (11): 3796–3806.
- Szabo, S. J., S. T. Kim, G. L. Costa, X. Zhang, C. G. Fathman, and L. H. Glimcher. 2000. "A Novel Transcription Factor, T-Bet, Directs Th1 Lineage Commitment." *Cell* 100 (6): 655–69.
- Takahashi, Ken, Taro Kawai, Himanshu Kumar, Shintaro Sato, Shin Yonehara, and Shizuo Akira. 2006. "Roles of Caspase-8 and Caspase-10 in Innate Immune Responses to Double-Stranded RNA." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 176 (8): 4520–24.
- Tarang, Shikha, Sushil Kumar, and Surinder K. Batra. 2012. "Mucins and Toll-like Receptors: Kith and Kin in Infection and Cancer." *Cancer Letters* 321 (2): 110–19. doi:10.1016/j.canlet.2012.01.040.
- Taylor, Philip R., Gordon D. Brown, Delyth M. Reid, Janet A. Willment, Luisa Martinez-Pomares, Siamon Gordon, and Simon Y. C. Wong. 2002. "The Beta-Glucan Receptor, Dectin-1, Is Predominantly Expressed on the Surface of Cells of the Monocyte/Macrophage and Neutrophil Lineages." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 169 (7): 3876–82.
- Taylor, Philip R., S. Vicky Tsoni, Janet A. Willment, Kevin M. Dennehy, Marcela Rosas, Helen Findon, Ken Haynes, et al. 2007. "Dectin-1 Is Required for Beta-Glucan Recognition and Control of Fungal Infection." *Nature Immunology* 8 (1): 31–38. doi:10.1038/ni1408.
- Thebault, P., T. Condamine, M. Heslan, M. Hill, I. Bernard, A. Saoudi, R. Josien, I. Anegon, M. C. Cuturi, and E. Chiffoleau. 2007. "Role of IFN γ in Allograft Tolerance Mediated by CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells by Induction of IDO in Endothelial Cells." *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 7 (11): 2472–82. doi:10.1111/j.1600-6143.2007.01960.x.
- Thebault, Pamela, Natacha Lhermite, Gaëlle Tilly, Laëtizia Le Texier, Thibaut Quillard, Michele Heslan, Ignacio Anegon, et al. 2009. "The C-Type Lectin-like Receptor CLEC-1, Expressed by Myeloid Cells and Endothelial Cells, Is up-Regulated by Immunoregulatory Mediators and Moderates T Cell Activation." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183 (5): 3099–3108. doi:10.4049/jimmunol.0803767.
- Theodoulou, Natalie H., Paul Bamborough, Andrew J. Bannister, Isabelle Becher, Rino A. Bit, Ka Hing Che, Chun-wa Chung, et al. 2016. "Discovery of I-BRD9, a Selective Cell Active

- Chemical Probe for Bromodomain Containing Protein 9 Inhibition." *Journal of Medicinal Chemistry* 59 (4): 1425–39. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00256.
- Torres-Aguilar, Honorio, Sergio R. Aguilar-Ruiz, Gabriela González-Pérez, Rosario Munguía, Sandra Bajaña, Marco A. Meraz-Ríos, and Carmen Sánchez-Torres. 2010. "Tolerogenic Dendritic Cells Generated with Different Immunosuppressive Cytokines Induce Antigen-Specific Anergy and Regulatory Properties in Memory CD4+ T Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 184 (4): 1765–75. doi:10.4049/jimmunol.0902133.
- Trapani, Joseph A., and Mark J. Smyth. 2002. "Functional Significance of the Perforin/Granzyme Cell Death Pathway." *Nature Reviews. Immunology* 2 (10): 735–47. doi:10.1038/nri911.
- Troegeler, Anthony, Ingrid Mercier, Céline Cougoule, Danilo Pietretti, André Colom, Carine Duval, Thien-Phong Vu Manh, et al. 2017. "C-Type Lectin Receptor DCIR Modulates Immunity to Tuberculosis by Sustaining Type I Interferon Signaling in Dendritic Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (4): E540–49. doi:10.1073/pnas.1613254114.
- Tsang, Emily, Anthony M. Giannetti, David Shaw, Marie Dinh, Joyce K. Y. Tse, Shaan Gandhi, Hoangdung Ho, Sandra Wang, Eva Papp, and J. Michael Bradshaw. 2008. "Molecular Mechanism of the Syk Activation Switch." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (47): 32650–59. doi:10.1074/jbc.M806340200.
- Turnquist, Heth R., Giorgio Raimondi, Alan F. Zahorchak, Ryan T. Fischer, Zhiliang Wang, and Angus W. Thomson. 2007. "Rapamycin-Conditioned Dendritic Cells Are Poor Stimulators of Allogeneic CD4+ T Cells, but Enrich for Antigen-Specific Foxp3+ T Regulatory Cells and Promote Organ Transplant Tolerance." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 178 (11): 7018–31.
- Uto, Tomofumi, Tomohiro Fukaya, Hideaki Takagi, Keiichi Arimura, Takeshi Nakamura, Naoya Kojima, Bernard Malissen, and Katsuaki Sato. 2016. "Clec4A4 Is a Regulatory Receptor for Dendritic Cells That Impairs Inflammation and T-Cell Immunity." *Nature Communications* 7 (April): 11273. doi:10.1038/ncomms11273.
- Valladeau, J., V. Duvert-Frances, J. J. Pin, C. Dezutter-Dambuyant, C. Vincent, C. Massacrier, J. Vincent, et al. 1999. "The Monoclonal Antibody DCGM4 Recognizes Langerin, a Protein Specific of Langerhans Cells, and Is Rapidly Internalized from the Cell Surface." *European Journal of Immunology* 29 (9): 2695–2704. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199909)29:09<2695::AID-IMMU2695>3.0.CO;2-Q.
- Veldhoen, Marc, Richard J. Hocking, Christopher J. Atkins, Richard M. Locksley, and Brigitta Stockinger. 2006. "TGFbeta in the Context of an Inflammatory Cytokine Milieu Supports de Novo Differentiation of IL-17-Producing T Cells." *Immunity* 24 (2): 179–89. doi:10.1016/j.immuni.2006.01.001.
- Wallet, Mark A., Pradip Sen, and Roland Tisch. 2005. "Immunoregulation of Dendritic Cells." *Clinical Medicine & Research* 3 (3): 166–75.
- Wang, Li, Karina Pino-Lagos, Victor C. de Vries, Indira Guleria, Mohamed H. Sayegh, and Randolph J. Noelle. 2008. "Programmed Death 1 Ligand Signaling Regulates the Generation of Adaptive Foxp3+CD4+ Regulatory T Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (27): 9331–36. doi:10.1073/pnas.0710441105.
- Waskow, Claudia, Kang Liu, Guillaume Darrasse-Jèze, Pierre Guermonprez, Florent Ginhoux, Miriam Merad, Tamara Shengelia, Kaihui Yao, and Michel Nussenzweig. 2008. "The Receptor Tyrosine Kinase Flt3 Is Required for Dendritic Cell Development in Peripheral Lymphoid Tissues." *Nature Immunology* 9 (6): 676–83. doi:10.1038/ni.1615.
- Watanabe, Norihiko, Yi-Hong Wang, Heung Kyu Lee, Tomoki Ito, Yui-Hsi Wang, Wei Cao, and Yong-Jun Liu. 2005. "Hassall's Corpuscles Instruct Dendritic Cells to Induce CD4+CD25+

- Regulatory T Cells in Human Thymus." *Nature* 436 (7054): 1181–85.
doi:10.1038/nature03886.
- Wells, Christine A., Judith A. Salvage-Jones, Xin Li, Kelly Hitchens, Suzanne Butcher, Rachael Z. Murray, Anthony G. Beckhouse, et al. 2008. "The Macrophage-Inducible C-Type Lectin, Mincle, Is an Essential Component of the Innate Immune Response to *Candida Albicans*." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 180 (11): 7404–13.
- Werninghaus, Kerstin, Anna Babiak, Olaf Gross, Christoph Hölscher, Harald Dietrich, Else Marie Agger, Jörg Mages, et al. 2009. "Adjuvanticity of a Synthetic Cord Factor Analogue for Subunit Mycobacterium Tuberculosis Vaccination Requires FcRgamma-Syk-Card9-Dependent Innate Immune Activation." *The Journal of Experimental Medicine* 206 (1): 89–97. doi:10.1084/jem.20081445.
- Wevers, Brigitte A., Tanja M. Kaptein, Esther M. Zijlstra-Willems, Bart Theelen, Teun Boekhout, Teunis B. H. Geijtenbeek, and Sonja I. Gringhuis. 2014. "Fungal Engagement of the C-Type Lectin Mincle Suppresses Dectin-1-Induced Antifungal Immunity." *Cell Host & Microbe* 15 (4): 494–505. doi:10.1016/j.chom.2014.03.008.
- Willment, Janet A., Andrew S. J. Marshall, Delyth M. Reid, David L. Williams, Simon Y. C. Wong, Siamon Gordon, and Gordon D. Brown. 2005. "The Human Beta-Glucan Receptor Is Widely Expressed and Functionally Equivalent to Murine Dectin-1 on Primary Cells." *European Journal of Immunology* 35 (5): 1539–47. doi:10.1002/eji.200425725.
- Woltman, A. M., J. W. de Fijter, S. W. Kamerling, L. C. Paul, M. R. Daha, and C. van Kooten. 2000. "The Effect of Calcineurin Inhibitors and Corticosteroids on the Differentiation of Human Dendritic Cells." *European Journal of Immunology* 30 (7): 1807–12. doi:10.1002/1521-4141(200007)30:7<1807::AID-IMMU1807>3.0.CO;2-N.
- Wu, Junjie, Marie Jordan, and David J. Waxman. 2016. "Metronomic Cyclophosphamide Activation of Anti-Tumor Immunity: Tumor Model, Mouse Host, and Drug Schedule Dependence of Gene Responses and Their Upstream Regulators." *BMC Cancer* 16 (August): 623. doi:10.1186/s12885-016-2597-2.
- Wu, Li, and Ken Shortman. 2005. "Heterogeneity of Thymic Dendritic Cells." *Seminars in Immunology* 17 (4): 304–12. doi:10.1016/j.smim.2005.05.001.
- Wüthrich, Marcel, Huafeng Wang, Mengyi Li, Tassanee Lerksuthirat, Sarah E. Hardison, Gordon D. Brown, and Bruce Klein. 2015. "Fonsecaea Pedrosoi-Induced Th17-Cell Differentiation in Mice Is Fostered by Dectin-2 and Suppressed by Mincle Recognition." *European Journal of Immunology* 45 (9): 2542–52. doi:10.1002/eji.201545591.
- Xie, Jianhui. 2012. "The C-Type Lectin-like Receptors of Dectin-1 Cluster in Natural Killer Gene Complex." *Glycoconjugate Journal* 29 (5–6): 273–84. doi:10.1007/s10719-012-9419-9.
- Yamaguchi, Takahisa, Sachio Fushida, Yasuhiko Yamamoto, Tomoya Tsukada, Jun Kinoshita, Katsunobu Oyama, Tomoharu Miyashita, et al. 2016. "Tumor-Associated Macrophages of the M2 Phenotype Contribute to Progression in Gastric Cancer with Peritoneal Dissemination." *Gastric Cancer: Official Journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association* 19 (4): 1052–65. doi:10.1007/s10120-015-0579-8.
- Yamamoto, Masahiro, and Kiyoshi Takeda. 2010. "Current Views of Toll-like Receptor Signaling Pathways." *Gastroenterology Research and Practice* 2010: 240365. doi:10.1155/2010/240365.
- Yamasaki, Sho, Eri Ishikawa, Machie Sakuma, Hiromitsu Hara, Koji Ogata, and Takashi Saito. 2008. "Mincle Is an ITAM-Coupled Activating Receptor That Senses Damaged Cells." *Nature Immunology* 9 (10): 1179–88. doi:10.1038/ni.1651.
- Yamasaki, Sho, Makoto Matsumoto, Osamu Takeuchi, Tetsuhiro Matsuzawa, Eri Ishikawa, Machie Sakuma, Hiroaki Tateno, et al. 2009. "C-Type Lectin Mincle Is an Activating Receptor for Pathogenic Fungus, *Malassezia*." *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America* 106 (6): 1897–1902.
doi:10.1073/pnas.0805177106.
- Yamazaki, Sayuri, Diana Dudziak, Gordon F. Heidkamp, Christopher Fiorese, Anthony J. Bonito, Kayo Inaba, Michel C. Nussenzweig, and Ralph M. Steinman. 2008. "CD8+ CD205+ Splenic Dendritic Cells Are Specialized to Induce Foxp3+ Regulatory T Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181 (10): 6923–33.
- Yamazaki, Sayuri, Tomonori Iyoda, Kristin Tarbell, Kara Olson, Klara Velinzon, Kayo Inaba, and Ralph M. Steinman. 2003. "Direct Expansion of Functional CD25+ CD4+ Regulatory T Cells by Antigen-Processing Dendritic Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 198 (2): 235–47. doi:10.1084/jem.20030422.
- Yokosuka, Tadashi, and Takashi Saito. 2009. "Dynamic Regulation of T-Cell Costimulation through TCR-CD28 Microclusters." *Immunological Reviews* 229 (1): 27–40.
doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00779.x.
- Zaba, Lisa C., James G. Krueger, and Michelle A. Lowes. 2009. "Resident And 'inflammatory' dendritic Cells in Human Skin." *The Journal of Investigative Dermatology* 129 (2): 302–8. doi:10.1038/jid.2008.225.
- Zakharova, Maria, and H. Kirk Ziegler. 2005. "Paradoxical Anti-Inflammatory Actions of TNF-Alpha: Inhibition of IL-12 and IL-23 via TNF Receptor 1 in Macrophages and Dendritic Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (8): 5024–33.
- Zelensky, Alex N., and Jill E. Gready. 2005. "The C-Type Lectin-like Domain Superfamily." *The FEBS Journal* 272 (24): 6179–6217. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.05031.x.
- Zhan, Yifan, Emma M. Carrington, Annemarie van Nieuwenhuijze, Sammy Bedoui, Shirley Seah, Yuekang Xu, Nancy Wang, et al. 2011. "GM-CSF Increases Cross-Presentation and CD103 Expression by Mouse CD8⁺ Spleen Dendritic Cells." *European Journal of Immunology* 41 (9): 2585–95. doi:10.1002/eji.201141540.
- Zhang, Pei, Scott Snyder, Peter Feng, Parastoo Azadi, Shusheng Zhang, Silvia Bulgheresi, Kenneth E. Sanderson, Johnny He, John Klena, and Tie Chen. 2006. "Role of N-Acetylglucosamine within Core Lipopolysaccharide of Several Species of Gram-Negative Bacteria in Targeting the DC-SIGN (CD209)." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 177 (6): 4002–11.
- Zhao, Xibao, Yaping Shen, Weiwei Hu, Junru Chen, Tian Wu, Xiaoqiang Sun, Juan Yu, Tingting Wu, and Weilin Chen. 2015. "DCIR Negatively Regulates CpG-ODN-Induced IL-1 β and IL-6 Production." *Molecular Immunology* 68 (2 Pt C): 641–47.
doi:10.1016/j.molimm.2015.10.007.
- Zheng, Yong, Claire N. Manzotti, Michael Liu, Fiona Burke, Karen I. Mead, and David M. Sansom. 2004. "CD86 and CD80 Differentially Modulate the Suppressive Function of Human Regulatory T Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 172 (5): 2778–84.

Thèse de Doctorat

Prénom NOM : *María Dolores LÓPEZ ROBLES*

Titre de thèse : *Étude de CLEC-1, un récepteur Lectin-like de type C dans la fonction des cellules dendritiques et la tolérance immunitaire*

Title of thesis : *Study of CLEC-1, a C-type Lectin-like receptor in dendritic cell function and immune tolerance*

Résumé

Les cellules dendritiques (DCs) sont essentielles pour connecter l'immunité innée et adaptative et orienter les réponses des lymphocytes T. Les récepteurs Lectin de type-C présents dans les DCs sont activés par des ligands exogènes et endogènes, ce qui dicte la réponse aux agents pathogènes par la modulation de la réponse T immunitaire. Nous avons déjà décrit chez le rat, l'expression de CLEC-1 dans les DCs et nous avons démontré *in vitro* son rôle inhibiteur dans l'activation de la réponse T helper (Th17). Dans cette étude, nous avons examiné l'expression et la fonction de CLEC-1 dans les DCs humaines et nous avons montré son expression à la surface cellulaire de la sous-population de DCs CD16⁻ dans le sang et sur les DCs dérivées des monocytes (moDCs). L'expression de CLEC-1 sur les moDCs est diminuée par des stimuli inflammatoires et renforcée par le TGF- β . De plus, nous avons démontré que CLEC-1 est un récepteur fonctionnel sur les moDCs humains et que, bien qu'il ne module pas la voie classique d'activation du facteur de transcription NF κ B lié à la protéine kinase Syk, il réprime la réponse ultérieure Th17. De façon très importante, en utilisant des rats déficients pour CLEC-1, nous avons montré que la perturbation de la signalisation de CLEC-1 conduit à une surexpression de la sous-unité Il-12p40 dans les DCs, et à une exacerbation des réponses CD4⁺ Th1 et Th17 *in vitro* et *in vivo*. Collectivement, nos résultats établissent le rôle inhibiteur de CLEC-1 dans les DCs, capable d'amortir leur activation et la réponse ultérieure Th17. CLEC-1 peut représenter une cible thérapeutique utile pour moduler les réponses immunitaires T dans un contexte clinique.

Mots clés

Cellules dendritiques, CLEC-1, Immunité innée et adaptative, Réponse T helper

Abstract

Dendritic cells (DCs) represent essential antigen-presenting cells that are critical for linking innate and adaptive immunity, and influencing T-cell responses. Among pattern recognition receptors, DCs express C-type lectin receptors triggered by both exogenous and endogenous ligands, therefore dictating pathogen response, and also shaping T-cell immunity. We previously described in rat, the expression of the orphan C-type lectin-like receptor-1 (CLEC-1) by DCs and demonstrated *in vitro* its inhibitory role in downstream T helper 17 (Th17) activation. In this study, we examined the expression and functionality of CLEC-1 in human DCs, and show a cell-surface expression on the CD16⁺ subpopulation of blood DCs and on monocytederived DCs (moDCs). CLEC-1 expression on moDCs is downregulated by inflammatory stimuli and enhanced by TGF- β . Moreover, we demonstrate that CLEC-1 is a functional receptor on human moDCs and that although not modulating the spleen tyrosine kinase (Syk) dependent canonical nuclear factor- κ B (NF κ B) pathway, represses subsequent Th17 responses. Importantly, using CLEC-1-deficient rats, we showed that disruption of CLEC-1 signaling led to an enhanced Il-12p40 subunit expression in DCs, and to an exacerbation of downstream *in vitro* and *in vivo* CD4⁺ Th1 and Th17 responses. Collectively, our results establish a role for CLEC-1 as an inhibitory receptor in DCs able to dampen activation and downstream effector Th responses. As a cell-surface receptor, CLEC-1 may represent a useful therapeutic target for modulating T-cell immune responses in a clinical setting.

Key Words

Dendritic cell, CLEC-1, Innate and adaptive immunity, T helper response
