

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

**ETUDE DU ROLE DES SOUS-POPULATIONS DE CELLULES
DENDRITIQUES DANS L'EXPANSION ET LES FONCTIONS
DES CELLULES T REGULATRICES CHEZ LE RAT**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale Chimie-Biologie
Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : Immunologie

présentée
et soutenue publiquement par

OUABED Asmahan

Le 19 Decembre 2007, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs : SALOMON Benoit, chercheur DR2 Inserm, Paris
LE MAUFF Brigitte, PU-PH, Caen
Examineur : ANEGON Ignacio, DR2 Inserm, Nantes
Directeur de thèse : JOSIEN Regis, CR1 Inserm, Nantes

LISTES DES ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ARN : Acide RiboNucléique
BMDC : "Bone Marrow Dendritic Cell"
CCR: Chemokine receptor
CD : "Cluster Differentiation"
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA: Cellule Présentatrice d'Antigène
CpG ODN : CpG Oligodeoxynucleotide
CTL : Cytotoxic T Lymphocyte
CTLA-4 : « Cytotoxic T lymphocyte antigen
DC : Dendritic Cell (cellule dendritique)
FLT3-L : "Fms-Like Tyrosine Kinase 3 Ligand"
FoxP3: Forkhead Box P3
G-CSF: "Granulocyte Colony Stimulating Factor"
GITR: "Glucocorticoid-Induced TNF Receptor"
GM-CSF: "Granulocyte-Monocyte Colony Stimulating Factor"
HEV: High Endothelial Venule
HLA: Antigène des Leucocytes Humains (Human Leucocyte Antigen)
IFN: interferon
Ig: Immunoglobuline
IL: Interleukine
IPC: IFN- α producing cells
IRF-7: IFN regulatory factor 7
LPS: LipoPolySaccharide
M-CSF: Macrophage Colony Stimulating Factor
NFKB: Facteur Nucléaire des chaînes légères des immunoglobulines
NK : Cellule « Natural Killer »
PAMPs : Pathogen
PBMC : « Peripheral Blood Mononuclear Cell »
pDC: plasmacytoïde Dendritic Cell
PGN: PeptidoGlycane
Poly I:C: PolyInosine-polyCytidilique acid
Pre-DC: Précurseur de cellules dendritiques
RLM: Réaction lymphocytaire mixte
TCR: T Cell Receptor
TGF: Tumor Growth Factor
Th: T helper ou T auxiliaire
TLR: Toll-Like Receptor
TNF: Tumor Necrosis Factor
TOLLIP: " Toll-interacting Protein"
T reg: Lymphocyte T régulateur
TRAIL : TNF related apoptosis inducing ligand

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Ontogenèse des cellules dendritiques humaines.	20
Figure 2 : Les voies principales de la capture antigénique.	25
Figure 3 : Ligands des TLR et leurs ligands.	27
Figure 4 : Schéma représentatif de la structure et des voies de signalisation des différentes familles des PRR	31
Figure 5 : Les voies d'accès au CMH de classe I	35
Figure 6 : La synapse immunologique	42
Figure 7 : Les différentes réponses TCD4 et CD8 obtenues in vitro en présence de pDC stimulées dans différentes conditions	55
Figure 8 : Rôle des CpG dans la réponse immune	58
Figure 9 : Modèle de développement des lymphocytes TCD4+ CD25+ naturels lors de la sélection thymique à partir des lymphocytes TCD4+ conventionnels	65
Figure 10 :Régulation de l'homéostasie périphérique des Treg CD4+ CD25+ par l'IL-2	67
Figure 11 : Méthode utilisée pour l'analyse du phénotype des cellules T CD4+ CD25+ et CD25-	134
Figure 12 Phénotype des cellules TCD4+ CD25+ et CD25- dans la rate.	135
Figure 13 Phénotype des cellules TCD4+ CD25+ dans les ganglions lymphatiques	136
Figure 14 Phénotype des cellules TCD4+ CD25+ et CD25- dans le sang	137
Figure 15 Tri des cellules T CD4+ D25+	138
Figure 16 Tri des cellules TCD4+ CD25-, CD4+CD25 faible et TCD4+CD25forte	138
Figure 17 Prolifération des cellules TCD4+ CD25+ et TCD4+ CD25- allogéniques de la rate des ganglions induite par les sous-populations de DC	139
Figure 18 : Analyse de l'effet suppresseur des cellules TCD4+ CD25+ sur les TCD25-	140
Figure 19 : Analyse de l'activité suppressive des TCD4+ CD25+ in vivo après stimulation par les pDC matures du donneur	141

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01 : Les sous-populations de DC chez la souris	14
Tableau 02 : Caractéristiques des populations de DC spléniques chez le rat	17
Tableau03 : Schéma représentant le développement des Pré-pDC à partir d'un progéniteur précoce CD34+	51

Table des matières

Liste des Abréviations.....	4
Liste des Figures.....	5
Liste des Tableaux.....	6
INTRODUCTION.....	9
I. Les cellules dendritiques.....	10
1.1 Historique.....	10
1.2 Généralités et rôle des cellules dendritiques.....	11
1.3 Les sous-populations des cellules dendritiques.....	11
1.3.1 Les cellules dendritiques dites conventionnelles (CDC).....	12
1.3.1.1 Les cellules dendritiques migratoires.....	12
1.3.1.2 Les cellules dendritiques résidentes des organes lymphoïdes.....	12
1.3.2 Les cellules dendritiques plasmacytoïdes.....	15
1.3.3 Les cellules dendritiques inflammatoires.....	18
1.4 Ontogénie des cellules dendritiques.....	18
1.4.1 Ontogénie des cellules dendritiques chez l'homme.....	19
1.4.2 Ontogénie des cellules dendritiques chez la souris.....	21
II. Les cellules dendritiques et immunité innée.....	23
II.1 La capture antigénique.....	23
II.1.1 L'endocytose.....	23
II. 1.2 La phagocytose.....	24
II. 1.3 La macropinocytose.....	24
II.2 L'activation des cellules dendritiques.....	25
II.2.1 Les Toll-like Récepteurs (TLR).....	26
II.2.1.1 Découverte.....	26
II.2.1.2 Implication des TLR dans la reconnaissance des pathogènes....	27
II.2.1.3 Les voies de signalisation des TLR.....	31
II.2.1.4 Autres facteurs activant les cellules dendritiques.....	32
III. Les cellules dendritiques : Cellules initiateuses et régulatrices de la réponse adaptative.....	33
III. 1 Apprêtement antigénique.....	33
III.1.1 Le CMH de classe L.....	34
III.1.2 Le CMH de classe II.....	36
III. 1.3 La présentation croisée.....	36
III.1.4 Le CD1.....	37
III.2 Maturation et Migration des cellules dendritiques.....	39
III.2.1 La maturation des cellules dendritiques.....	39
III.2.2 La migration des cellules dendritiques.....	39
III.2.2.1 Les chimiokines.....	40
III.2.2.2 Expression des récepteurs de chimiokines.....	41
III.2.2.3 Production des chimiokines par les cellules dendritiques.....	41
III.3 L'activation des lymphocytes T.....	42
III.3.1 La mise en place de la synapse immunologique.....	42
III.3.2 Le signal de costimulation.....	43
III.3.3 La différenciation des cellules TCD4+.....	43
III.3.4 La différenciation des cellules TCD8+.....	45

IV. Les cellules dendritiques plasmacytoides	46
IV.1 Localisation des cellules dendritiques plasmacytoides dans l'organisme.....	47
IV.2 Identification des cellules dendritiques plasmacytoides.....	48
IV.2.1 Morphologie des cellules dendritiques plasmacytoides.....	48
IV.2.2 Marqueurs phénotypiques des cellules dendritiques plasmacytoides.....	49
IV.2.3 Origine des cellules dendritiques plasmacytoides.....	50
IV.2.4 Génération des cellules dendritiques plasmacytoides in vitro.....	51
IV.2.5 Caractéristiques fonctionnelles des cellules dendritiques plasmacytoides	52
IV.2.6 Orientation de la réponse immune.....	53
IV.2.7 Cellules dendritiques plasmacytoides et IFN type I.....	56
IV.2.8 Cellules dendritiques plasmacytoides et Toll like receptor.....	57
IV.2.8.1 TLR 9.....	57
IV.2.8.2 TLR 7.....	59
V. La tolérance	59
V.1 La tolérance centrale.....	59
V.2 La tolérance périphérique.....	60
V.2.1 L'anergie.....	60
V.2.3 Délétion clonale.....	60
V.2.3 Ignorance immune.....	61
V.2.4 La déviation immune.....	61
V.2.5 La suppression active.....	62
V.3 Les cellules régulatrices.....	63
V.3.1 Les cellules T régulatrices naturelles.....	63
V.3.1.1 Les cellules CD4+CD25+.....	63
V.3.1.1.1 Origine et caractéristiques phénotypiques.....	63
V.3.1.1.2 Mécanismes d'action.....	68
V.3.1.2 Les autres cellules régulatrices naturelles.....	70
V.3.2 Les cellules régulatrices induites.....	71
V.3.2.1 Les cellules Th3.....	71
V.3.2.2 Les cellules régulatrices 1 (Tri).....	71
V.3.2.3 Les cellules T régulatrices CD8+.....	72
V.4 Induction des lymphocytes T régulateurs par les DC.....	74
Objectif de l'étude	76
Résultats	78
I. Article I	79
I.1 Résumé de l'article 1.....	80
II. Article II	91
II.1. Résumé de l'article 2.....	92
II.2 Résultats complémentaires.....	135
Discussion	144
Bibliographie	152

I. LES CELLULES DENDRITIQUES

I.1 Historique

La découverte des cellules dendritiques remonte à l'année 1868 quand Paul Langerhans découvrit l'existence d'une population de cellule de morphologie dendritique au sein de l'épiderme cutané. Pendant plus d'un siècle, les cellules de Langerhans furent assimilées à des cellules d'origine neurale, avant que l'on démontre leur origine hématopoïétique (Steinman, 1991). Ce n'est qu'en 1973, que le terme « cellule dendritique » (en anglais *dendritic cell*, DC) fut introduit par Ralph Steinman, qui travaillait dans le laboratoire de Zanvil Cohn à la Rockefeller University à New York sur les fonctions des cellules dites accessoires (Steinman and Cohn, 1973). Au cours des années 1960, la théorie dominante de la sélection clonale établie par Burnet impliquait que la présence de l'antigène suffisait à sélectionner et à provoquer la multiplication du lymphocyte spécifique (Burnet, 1960). En revanche, la mise en œuvre de cette activation lymphocytaire *in vitro* s'avérait difficile sans la présence de cellules dites accessoires. Ces cellules accessoires étaient nécessaires à l'induction d'une réponse anticorps primaire *in vitro*. Ces cellules accessoires spléniques pouvaient être séparées des autres cellules, et notamment des lymphocytes, grâce à leur propriété d'adhérence au verre ou au plastique et à leur faible densité. C'est en étudiant ces cellules accessoires que Ralph Steinman identifia une nouvelle population de leucocytes, différente des macrophages, et nommée DC en raison de leurs longs prolongements cytoplasmiques caractéristiques. Outre ces caractères morphologiques, les DC étaient alors caractérisées par une forte mobilité, une faible activité endocytaire, une adhérence au plastique transitoire (Steinman, 1991). Ces cellules représentent moins de 1% de l'ensemble des cellules dans le sang et les tissus lymphoïdes. Actuellement, il est possible d'obtenir de grandes quantités de DC, *in vitro*, à partir de progéniteurs médullaires mais aussi grâce à des techniques, comme la cytofluorométrie de flux qui a permis de décrire et étudier les molécules de surface spécifiquement exprimées par les DC qui s'avèrent désormais fondamentales dans le contrôle des réponses immunitaires (Banchereau and Steinman, 1998).

I.2 Généralités et rôle des cellules dendritiques

Les DC constituent une rare population de leucocytes spécialisés dans la présentation antigénique aux lymphocytes T. Elles jouent un rôle crucial dans la réponse immunitaire innée et adaptative (Banchereau and Steinman, 1998). En effet, l'organisme possède un système de défense innée ou naturelle contre les infections et fait intervenir des cellules phagocytaires (macrophages, polynucléaires neutrophiles), des cellules cytotoxiques (cellules natural Killer, NK), et des molécules solubles telles que les cytokines (Interférons) et le complément. Le rôle des DC dans la réponse innée réside dans la phagocytose et la création d'un foyer inflammatoire par la production de différents chimiokines pro-inflammatoires. Après avoir phagocyté l'agent étranger, elles migrent vers les organes lymphoïdes secondaires pour présenter les antigènes aux lymphocytes T et B et donc initier la réponse spécifique. Les lymphocytes B expriment des immunoglobulines de surface qui sont capables de reconnaître les antigènes sous leur forme native. Les lymphocytes T expriment des récepteurs à l'antigène (TCR) qui reconnaissent les antigènes protéiques sous forme peptidique, présentés par des molécules du CMH. Afin d'être reconnu par le lymphocyte, l'antigène doit donc être apprêté, et cet apprêtement a lieu dans les cellules dites présentatrices d'antigène (CPA). Il existe trois principales populations de CPA : les macrophages, les lymphocytes B, et les cellules dendritiques (DC). Alors que les fonctions primaires des macrophages et des lymphocytes B sont respectivement d'éliminer les pathogènes et de produire des Ig, la présentation de l'antigène aux cellules T est la principale fonction connue des DC matures. De plus, seules les DC sont capables de stimuler des lymphocytes T naïfs, alors que toutes les CPA sont capables de stimuler des cellules T activées ou mémoire. Ceci est une caractéristique majeure des DC qui sont donc essentielles à l'initiation de la réponse immunitaire adaptative contre un antigène nouveau. Elles méritent donc le nom de CPA « professionnelles » (Matzinger, 1994).

I.3 Les sous-populations des cellules dendritiques

L'étude des cellules dendritiques a révélé l'existence de plusieurs populations de DC, spécialisées dans la capture, l'apprêtement et la présentation antigénique aux lymphocytes T. L'hétérogénéité des cellules dendritiques est déterminée par plusieurs facteurs : selon leur localisation, leur stade de maturation et leur ontogénie.

I.3.1 Les cellules dendritiques dites conventionnelles (CDC)

Elles correspondent aux DC initialement décrites par Steinman et al. On distingue deux catégories de cellules dendritiques conventionnelles dont la principale différence est leur capacité migratoire : les cellules dendritiques circulantes qui sont localisées dans la peau, dans les tissus périphériques et diverses muqueuses et les cellules dendritiques résidentes qui sont présentes dans les organes lymphoïdes.

I.3.1.1 Les cellules dendritiques migratoires

Les DC migratoires sont localisées dans la peau, dans les muqueuses et les tissus périphériques et aussi dans les ganglions lymphatiques. Elles représentent l'ensemble des cellules dendritiques dermiques, cellules dendritiques interstitielles et les cellules de Langerhans (Romani et al., 2001). Elles se distinguent les unes des autres en fonction du tissu d'origine au quel sont associées des caractéristiques phénotypiques différentes. Les cellules les mieux étudiées sont les cellules de Langerhans qui représentent 3 à 8% des cellules de l'épiderme et se caractérisent par une morphologie très étirée, l'expression de certains antigènes non spécifiques comme CD1a ou spécifique comme la langerine et la présence de granules de Birbeck (Valladeau et al., 2000). Ces granules de Birbeck sont des organites intracellulaires en forme de raquettes formés par la juxtaposition de deux feuilletts membranaires et seraient probablement un compartiment d'apprêtement antigénique. Ces granules disparaissent lors de la maturation.

Les DC migratoires jouent un rôle de sentinelle dans l'organisme. Lors d'une agression, elles transitent du sang vers les tissus périphériques. Là, elles internalisent les antigènes et engagent leur processus de maturation au contact des signaux de danger. Elles

migrent alors vers les ganglions lymphatiques où elles rencontrent les lymphocytes T et induisent les réponses immunes (Reis e Sousa, 2006).

I.3.1.2 Les cellules dendritiques résidentes des organes lymphoïdes

Les DC résidentes sont restreintes aux organes lymphoïdes. Elles représentent la plus grande partie des cellules dendritiques que l'on peut isoler de la rate, du thymus et des ganglions périphériques. On les retrouve essentiellement dans les zones T (manchon périartériolaire de la pulpe blanche de la rate et paracortex des ganglions lymphatiques), où elles furent nommées initialement cellules interdigitées en raison de leurs longs prolongements cytoplasmiques s'immiscant entre les cellules T (Steinman et al., 1997). Dans le thymus, les DC se localisent dans la médullaire et surtout à la jonction cortico médullaire (Inaba et al., 1994) et jouent un rôle majeur dans la sélection négative des thymocytes (Brocker et al., 1997). Des DC sont également présentes dans la zone marginale de la rate, ainsi que dans le cortex interfolliculaire des ganglions lymphatiques (Inaba et al., 1994).

a) Chez la souris: diverses populations de cellules dendritiques résidentes ont été identifiées en fonction de l'expression des molécules CD4 et CD8 (Tableau 1). Les marqueur CD11b et CD205 permettent également de discriminer des sous populations de DC murines (Shortman and Liu, 2002). Ces Dc résidant dans les organes lymphoïdes sont des DC dérivées du sang (Villadangos and Heath, 2005). Ces cellules se sont différenciées dans les organes lymphoïdes à partir de précurseurs de la moelle osseuse et n'ont pas forcément transité vers la périphérie (Liu et al., 2007; Naik et al., 2006).

Dans la rate, la presque totalité des DC spléniques expriment à leur surface le marqueur CD11c⁺, les molécules du CMH de classe II ainsi que les molécules de costimulation. Et l'étude de Vremec et al permet une ségrégation de trois populations de DC spléniques par les marqueurs CD4 et CD8 (Vremec et al., 2000). Ces trois populations de DC spléniques sont : CD4⁺ CD8⁻ CD11b⁺ CD205⁻, CD4⁻ CD8⁻ CD11b⁺ CD205⁻, et CD4⁻ CD8⁺ CD11b⁻ CD205⁺. Toutes ces populations présentent une activité optimale de présentation d'antigène et induisent l'activation des lymphocytes T dans les réactions mixtes allogéniques.

Une des caractéristique de la population de DC CD4⁺ est leur propriété initiale d'adhésion au plastique ce qui permet de les séparer des deux autres populations in vitro (Vremec et al., 2000). Les DC CD8⁻ spléniques peuvent acquérir l'expression du

CD8 ainsi que d'autres marqueurs spécifiques des DC CD8⁺ après transfert, ce qui laisse penser que l'expression du marqueur CD8 représente un stade de différenciation et/ou maturation des DC spléniques (del Hoyo et al., 2002). La présence de pDC au phénotype CD11c⁺ CD45RA⁺B220⁺ a également été observée dans la rate (Asselin-Paturel et al., 2001; Nakano et al., 2001). Ces pDC doivent provenir du sang périphérique (Wu and Liu, 2007).

Dans les ganglions lymphatiques, Henri et al ont montré qu'en plus des trois populations de DC retrouvées dans la rate, les ganglions lymphatiques possèdent deux autres sous populations de DC (Henri et al., 2001): des DC CD4⁻ CD8⁻ CD205^{faible} CD11b⁺ retrouvées au niveau des ganglions mésentériques et des DC CD4⁻ CD8^{faible} CD205^{fort} CD11b⁺ retrouvées au niveau des ganglions de la peau.

Dans le thymus, la majorité des DC expriment la molécule CD8⁺ (70%), cependant il est difficile de déterminer réellement la proportion des différentes population de DC car elles sont capables d'acquérir les molécules CD4 et CD8 des thymocytes (Vremec et al., 2000). Ces DC semblent jouer un rôle important dans la tolérance centrale au soi.

Les cellules CD8⁻ et CD8⁺ se différencient par des fonctions différentes telles que la production de cytokines ou la capacité à présenter des peptides antigéniques.

Tableau 1: Les sous-populations de DC résidentes chez la souris d'après (Villadangos and Schnorrer, 2007)

	DC CD4+	DC CD8+	DC DN
<i>Situation</i>			
Rate	Zone marginale Pulpe rouge	Zones T	Pulpe rouge Zone marginale
Ganglions lymphatiques sous-cutanés	+	+	+
Ganglions lymphatiques viscéraux	+	+	+
Thymus	+	+	+
<i>Marqueurs de surface</i>			
CD11c	+++	+++	+++
CD4	+	-	-
CD8	-	++	-
CD205	-	++	-/+
CD11b	++	-	++
Langerin	-	+	-
CD24	+	++	+

SIRP α	+	-	+
<i>Caractéristiques fonctionnelles à l'état de repos</i>			
Maturité	Immatures	Immatures	Immatures
Costimulation	+	+	+
Présentation antigénique	+++	+++	+++
CMH II	++	++	++

b) Chez l'homme : l'étude des différentes populations de cellules dendritiques chez l'homme est plus difficile que chez la souris, car les cellules dendritiques humaines n'expriment pas la molécule CD8 et aucune molécule alternative n'a été identifiée. En outre, du fait de la difficulté d'obtenir des organes lymphoïdes, très peu d'études sur les DC ont été réalisées. Les DC ont été étudiées essentiellement dans le sang, mais aussi dans les amygdales, dans l'épiderme et dans les tumeurs. Le sang reste le tissu le plus accessible et le plus disponible pour l'étude des DC. Cependant, leur fréquence reste faible.

c) Chez le rat : deux sous-populations de DC ont été identifiées dans la lymphe intestinale par le groupe de MacPherson (Pugh et al., 1983). Comme chez l'homme, les cellules dendritiques n'expriment pas la molécule CD8 ; en revanche, elles expriment le marqueur CD103 reconnu par l'anticorps OX62 (Brenan and Puklavec, 1992), la molécule CD4 et les différentes populations spléniques sont identifiées par la présence et ou l'absence des marqueurs CD4 et CD172 α (SIRP α). Notre équipe a identifié les DC CD4 $^-$ et CD4 $^+$ de la rate et des ganglions lymphatiques (Trinite et al., 2000) (Tableau 2). Les DC CD4 $^-$ sont de grandes productrices d'IL-12p40 et induisent une différenciation Th1. A l'inverse, les DC CD4 $^+$ stimulent efficacement les lymphocytes T CD8 $^+$ allogéniques et induisent une différenciation non polarisée dite Th0 (Voisine et al., 2002). Les DC CD4 $^-$ isolées de la rate, des ganglions lymphatiques mais du thymus sont douées de capacités cytotoxiques envers certaines cellules tumorales (Trinite et al., 2000). Il semblerait que les DC CD4 $^-$ soient l'équivalent des DC CD8 $^+$ chez la souris et que les DC CD4 $^+$ de rat correspondent aux DC CD8 $^-$ murines. Récemment, notre équipe a décrit les pDC chez le rat (Hubert et al., 2004) (Tableau 2). Ces pDC ont un phénotype CMH $^+$ CD4 $^+$ CD11b $^-$ et se distinguent des deux autres sous-populations de DC par une absence de CD103.

I.3.2 Les cellules dendritiques plasmacytoides

Les DC plasmacytoides ou pDC sont des cellules équivalentes aux interferon-producing cells ou IPC connues depuis de nombreuses années (Siegal et al., 1999). En effet, la caractéristique de ces cellules est de produire d'énormes quantités d'interféron de type 1 en réponse à une stimulation virale ou bactérienne. Elles expriment un répertoire limité de Toll-like receptor (TLR) avec une expression spécifique des TLR 7 et 9 ce qui leur confère une réponse spécifique à certains déterminant pathogéniques (Kadowaki et al., 2001). En fonction des espèces, le profil d'expression des marqueurs de surface des pDC est différent. **(Voir chapitre IV. Les cellules dendritiques plasmacytoides). Nous avons jugé intéressant de consacrer tout un chapitre aux pDC car comme décrit dans le deuxième papier soumis pour publication et contrairement aux DC conventionnelles, les pDC matures stimulées via TLR7 et TLR9 induisent une forte prolifération des cellules TCD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ en absence d'IL-2 exogène. Ce qui suggère un rôle des pDC dans le contrôle des T reg in vivo.**

Chez la souris, les pDC expriment la molécule CMHII et CD11c, et dans certaines conditions, la molécule CD8 (Grouard et al., 1997). Chez l'homme, ces cellules n'expriment ni la molécule CD11c, ni la molécule CD8. Chez le rat, les pDC n'expriment pas le marqueur spécifique de DC OX62 (CD103) et ont un phénotype CMH⁺ CD4⁺ CD11b⁻ (Hubert et al., 2004).

Plus loin voir le chapitre consacré aux cellules dendritiques plasmacytoides (Voir Chapitre IV).

**Tableau 2 : Caractéristiques des populations de DC spléniques chez le rat
d'après (Hubert et al., 2006; Hubert et al., 2004; Trinite et al., 2000; Voisine et al., 2002)**

Population	DC CD4-	DC CD4+	pDC
Phénotype			
CD4	-	+	+
CD8	-	-	-
CD5	-	+	+
CD90	+/-	+	+
CD45R	-	-	+
CD11b	+	+	-
CD11c	+	+	-
OX62	Fort	Faible	-
CD62L	-	-	+/-
CD40	-	-	-
CD80	+/-	+	-
CD86	-	-	+/-
CMH II	+	+	+
SIRPα	-	+	+
CD200	+	-	+
Expression des TLR	TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,	TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,	TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,

	9, 10	8, 9, 10	8, 9, 10
Localisation dans la rate	Zone T Pulpe rouge	Autour de la zone T	Zone T Pulpe rouge
Fonctions			
-Phagocytose de cellules apoptotiques	++	-	-
-Cytotoxicité	++	-	-
-Sécrétion d'IFN-α	-/+	-/+	++++
-Sécrétion d'IL-12p70	++	-	-
-Sécrétion d'IL-12p40	++	+/-	++
-Sécrétion d'IL-6	-/+	-/+	++
-Sécrétion d'IFN-γ	-	-	-
-MLR T CD4	++	+++	+
-MLR T CD8	+/-	+++	+/-
-Différenciation Th	Th1	Th1/Th0	Th1

Les annotations des TLR en gras signifient une forte expression de ces TLR par la sous-population de DC.

A l'état basal, les DC inflammatoires ne sont pas présentes. Elles apparaissent lors d'une inflammation ou d'une infection. En fonction de la cellule précurseur et du stimulus nécessaire pour provoquer leur recrutement ou leur différenciation, on distingue différents types de cellules dendritiques dites inflammatoires. Elles ont des fonctions diverses, en raison du spectre de cytokine qu'elles sont capables de produire. Elles sont générées à partir de précurseurs immédiats et sous l'influence de facteurs extérieurs elles se différencient en cellules dendritiques. Aussi ces précurseurs peuvent être considérés comme des réservoirs de DC permettant la production rapide de cellules dendritiques. Parmi ces derniers, les Tip (TNF and iNOS producing Dendritic cells) DC, ayant été mis en évidence, dans la rate de la souris, après infection par *Listeria monocytogenes*, sont représentatives de ce groupe. Ces cellules dérivant probablement des monocytes sanguins $CCR2^+ Gr1^+$, sous l'influence d'une infection ou d'une inflammation, les monocytes se différencient en DC fonctionnelles, capables de migrer vers les ganglions lymphatiques. Elles expriment la molécule CD11c et les molécules du CMH de classe II (Serbina et al., 2003; Vremec et al., 2000).

I.4 Ontogénie des cellules dendritiques

Les DC se différencient à partir des progéniteurs hématopoïétiques présents dans la moelle osseuse. Leur croissance et leur fonction nécessitent la présence de facteurs de croissance, essentiellement le GM-CSF (Granulocyte Monocyte- Colony Stimulating Factors) (Caux et al., 1996b). Des facteurs comme le FLT-3- ligand (Fine related tyrosine Kinase) (Pulendran et al., 2000), TNF alpha (Tumor Necrosis Factor) (Caux et al., 1996c) et d'autres cytokines seraient nécessaires pour le développement des différents types de DC.

Chez l'homme comme chez la souris, on distingue des DC dites « lymphoïdes » et des DC dites « myéloïdes ». Ces deux populations diffèrent par leurs marqueurs membranaires et les facteurs de croissance nécessaires à leur différenciation mais sont issues d'une seule souche hématopoïétique commune CD34⁺.

1.4.1 Ontogénie des cellules dendritique chez l'homme

Chez l'homme, cette cellule souche hématopoïétique CD34⁺ se différencie dans la moelle osseuse en précurseur lymphoïde (common lymphoïde progenitor, CLP) et en précurseur myéloïde (common myeloid progenitor, CMP) qui sera également à l'origine des polynucléaires neutrophiles, des macrophages, et des mégacaryocytes (Akashi et al., 2000). Les voies de différenciation des DC dites myéloïdes sont les plus connues (Steinman and Inaba, 1999). La culture de cellules souches hématopoïétiques CD34⁺, extraites de la moelle osseuse de adulte ou du sang de cordon, en présence de GM-CSF et de TNF alpha permet l'obtention de deux types de précurseurs intermédiaires CD14⁻ CD11c⁺ et CD14⁺ CD11c⁺ (Caux et al., 1996a; Caux et al., 1996b). A partir de ce stade, l'activité proliférative cesse. Sous l'action du GM-CSF, de l'IL-4 et du TGFbeta le précurseur CD14⁻ se différencie en cellules de Langerhans (Birbeck⁺, CD1a⁺, facteur de coagulation XIIIa⁻), qui expriment la molécule CLA (cutaneous lymphocyte-associated antigen) permettant leur migration vers la peau (Strunk et al., 1997). Le précurseur CD14⁺ (monocyte), sous l'action de GM-CSF et de L'IL-4 se différencie en DC immatures, dont l'équivalent in vivo est la DC interstitielle (Birbeck⁻, Langerine⁻, CD1a⁻, CD9⁺, CD68⁺, XIIIa⁺) (Caux et al., 1997). Il a été aussi démontré in vitro que l'origine

myéloïde des DC peut être due à la différenciation des monocytes en DC, en présence de GM-CSF et IL-4 (Sallusto and Lanzavecchia, 1994; Akagawa et al., 1996; Kiertscher and Roth, 1996; Pickl et al., 1996; Chapuis et al., 1997).

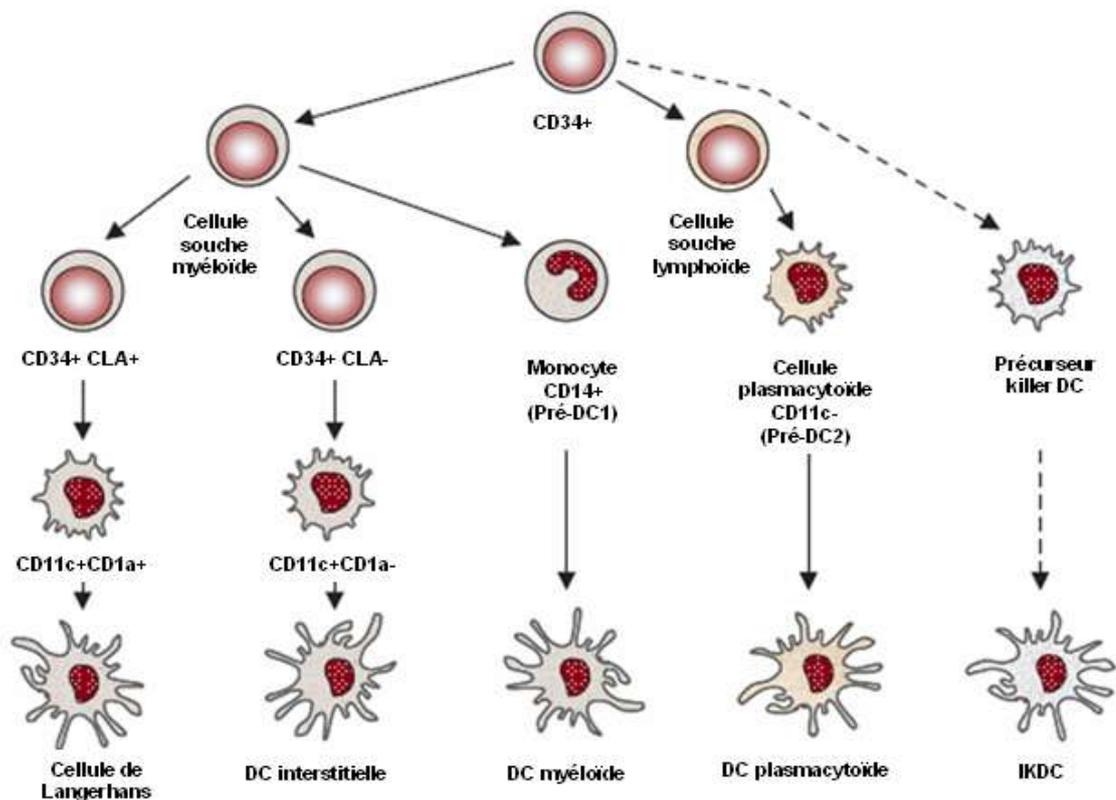


Figure 1 : Ontogénèse des cellules dendritiques humaines (d'après (Schott, 2006)).

Dans le sang, deux types de cellules précurseurs sont retrouvés (figure1). Les précurseurs appelés **pré-DC1** possèdent le marqueur CD14 et auraient une origine commune avec les cellules CD14+CD11+c de la moelle osseuse. En effet, il s'agit des monocytes, les précurseurs les plus utilisés in vitro pour l'obtention des DC myéloïdes à partir du sang. Les seconds précurseurs **pré-DC2** retrouvés dans le sang ne possède pas de marqueurs myéloïdes, n'exprimant pas le récepteur du GM-CSF. Il s'agit des DC plasmacytoïdes (Schott, 2006). La voie de développement des pDC n'est pas très bien comprise mais le Flt-3 est la principale cytokine impliquée dans le développement des pDC à la fois chez l'homme et chez la souris (Blom et al., 2000; Pulendran et al., 2000).

Récemment, une nouvelle sous-population de DC capable de produire de grandes quantités d'IFN de type I et possédant une activité cytolytique a été décrite (Chan et al., 2006; Taieb et al., 2006). Ces cellules dénommées Interferon-producing Killer Dendritic Cells (IKDC) se distinguent des DC conventionnelles et des pDC du fait de leur phénotype mixte de cellules NK et de DC. De part leur caractère mixte, l'origine des IKDC reste méconnue. Welner et al ont proposé que les IKDC provenaient d'un précurseur commun entre les DC et les cellules NK mais que leurs voies de différenciation divergeaient rapidement (Welner et al., 2007) (Figure 1).

Parallèlement à l'étude des DC chez l'homme, de nombreuses recherches ont été menées sur le modèle murin. Ces recherches et l'utilisation des animaux KO ou transgéniques apportent de précieux renseignements pour comprendre l'origine des cellules.

1.4.2 Ontogénie des cellules dendritiques chez la souris

Chez la souris, différentes origines hématopoïétiques des DC ont été suggérées pour les DC CD8⁺ thymiques et pour les DC CD8⁺ et CD8⁻ spléniques qui sont fonctionnellement différentes. Les DC thymiques CD8⁻ ont été décrites comme des DC lymphoïdes du fait de l'expression de marqueurs communs entre les cellules pro T et les DC (Ardavin, 1997) et de leur différenciation simultanée aux cellules T, à partir du précurseur commun lymphoïde (Shortman, 2000). Dans la rate, les DC CD8⁻ spléniques dériveraient du précurseur myéloïde commun (CMP) sous l'action du GM-CSF (Inaba et al., 1992) et les DC CD8⁺ thymiques sont considérées comme d'origine lymphoïde. Cependant, il a été montré que le CLP et le CMP pouvaient engendrer les deux types de DC CD8⁺ et CD8⁻ spléniques et thymiques (Wu et al., 2001). De plus, les DC CD8⁻ peuvent acquérir l'expression du CD8 et d'autres marqueurs spécifiques aux DC CD8⁺ après transfert, ce qui suggère que les DC CD8⁺ et CD8⁻ dans la rate représentent deux stades de maturation différents d'une même population de cellules (del Hoyo et al., 2002).

L'hypothèse d'une origine lymphoïde de certaines populations de DC est basée sur les études montrant que les DC murines pouvaient dériver d'un précurseur commun aux lymphocytes T, B et aux cellules NK (Ardavin et al., 1993). Cependant, la

différenciation clonale des DC à partir d'un précurseur lymphoïde n'a pas été montrée et l'origine lymphoïde des DC fait toujours débat (Dakic et al., 2004; Wu and Dakic, 2004).

Les précurseurs lymphoïdes entraînent la génération des DC plasmacytoides (pDC) (Ardavin et al., 2001). Les pDC murines présentent un phénotype CD11c^{dull}, CD4^{+/-}, IL-3R⁻, B220⁺ alors que les pDC humaines sont CD11C⁻, CD4⁺, IL-3R^{high}, CD45R⁻, CD45⁺ (Grouard et al., 1997; Olweus et al., 1997). Les pDC apparaissent progressivement au cours du développement embryonnaire de la souris et sont détectables au niveau du thymus à partir du 17^{ème} jour de la vie embryonnaire et le jour de la naissance dans la rate (Naik et al., 2005).

Chez la souris, les pDC sont caractérisées par la forte production d'IFN alpha en réponse à une stimulation virale (Asselin-Paturel et al., 2001). Le Flt-3 entraîne le développement des pDC à partir des cellules souches de la moelle osseuse. Cependant, le GM-CSF bloque complètement le développement de ces cellules in vitro (Blom et al., 2000; Gilliet et al., 2002).

O'Keeffe et al ont montré que la population pDC splénique murine est une population hétérogène quant à l'expression des molécules CD4 et CD8 et qu'elle peut être séparée en plusieurs sous-populations (O'Keeffe et al., 2002). L'utilisation de différentes techniques de transfert et d'incorporation du BrdU a montré que les pDC CD4⁻ pourraient être des précurseurs de pDC CD4⁺ (O'Keeffe et al., 2002; Yang et al., 2005). Toutefois, toutes les sous populations de pDC produisent de l'IFN alpha suite à une stimulation par les CpG mais seule la population CD4⁺ produit cette cytokine en réponse à une stimulation par *Staphylococcus aureus* (O'Keeffe et al., 2002). De plus, suite à une stimulation du TLR-2 (Toll-like receptor 2), seules la population pDC CD4⁻ produit du TNF alpha en présence à la stimulation, ce qui laisse suggérer que la fonction des pDC peut changer en fonction du stade de développement des ces cellules (Yang et al., 2005).

Il existe peu d'informations sur la relation entre les pDC CD8⁻ et CD8⁺. En revanche, toutes les cellules pDC, suite à une stimulation de leur TLR 7 et 9, présentent une population homogène qui exprime CD8^{high} CMH-II^{high}. In vivo, les pDC activées sont CD205⁻ à la différence des DC conventionnelles qui peuvent être CD205⁺ (Naik et al., 2005).

Par ailleurs, il a été démontré que les pDC peuvent se développer chez la souris KO pour les facteurs NOTCH 1 et T cell factor 1, facteurs essentiels pour le développement

des cellules T, ce qui remet en cause la certitude d'une origine lymphoïde des pDC (Ferrero et al., 2002). Aussi, des souris IL-7^{-/-} qui sont déficientes en lymphocytes T et B (Maki et al., 1996), présentent des pDC dans divers tissus (Yang et al., 2005). De leur côté, Toyama-Sorimachi et al. ont montré que les pDC en périphérie expriment à leur surface la molécule Ly49Q, récepteur identifié comme étant spécifique des cellules myéloïdes (Toyama-Sorimachi et al., 2004). Plus tard, ce même groupe a montré que les pDC du sang périphérique, de la moelle osseuse, les pDC hépatiques de même que les pDC générées en présence du Flt-3 contiennent aussi une sous-population de pDC Ly49Q⁻CMH-II⁻ (Omatsu et al., 2005; Toyama-Sorimachi et al., 2004). Les sous populations pDC Ly49Q⁻ et pDC Ly49Q⁺ produisent différents types de cytokines lors de leur stimulation. Cependant, il semble que la population Ly49Q⁻CMH-II⁻ produise une faible quantité d'IFN alpha, d'IL-6 et d'IL-12p70 suite à une stimulation par les séquences CpG ou le virus de l'hémagglutinine (Kamogawa-Schifter et al., 2005).

II. Les cellules dendritiques et l'immunité innée

II.1 La capture antigénique

Les phagocytes professionnels sont les polynucléaires neutrophiles (les polynucléaires éosinophiles et basophiles ont peu ou pas de fonctions phagocytaires), les macrophages et les cellules dendritiques. Les DC immatures sont des sentinelles spécialisées dans la capture des antigènes issus des cellules mortes, des pathogènes, des cellules infectées ou leur produits solubles pour les présenter aux lymphocytes T. Les voies utilisées pour la capture des antigènes par les DC sont principalement : l'endocytose, la phagocytose, et la macropinocytose.

Le mécanisme de capture des antigènes par endocytose et phagocytose est basé sur la présence de récepteurs à la surface des DC qui reconnaissent des motifs sur des pathogènes et permettent à la DC de les discriminer. Ils font partie majoritairement de la famille des lectines de type C (Dépendants du Ca²⁺).

Certains pathogènes peuvent utiliser la fonction de capture d'antigènes comme voie d'entrée pour une infection. L'exemple le plus utilisé est celui du virus HIV qui peut directement infecter les DC, ce qui entraîne une altération de la voie de présentation des antigènes (Geijtenbeek et al., 2000).

II.1.1 L'endocytose

Ce mécanisme permet l'internalisation de macromolécules, grâce à la formation d'un réseau de clathrine ou de calvéoline permettant la formation de vésicules d'endocytose (Roth, 2006). Différents récepteurs en assurent la spécificité : les récepteurs aux fragments Fc des immunoglobulines capables de fixer les complexes immuns (Fanger et al., 1996; Zhu et al., 2001), les récepteurs aux protéines de choc thermique tels CD91 ou Lox-1 (Lectin-like receptor for oxidized-LDL) (Basu et al., 2001; Delneste et al., 2002), les récepteurs de type scavenger comme CD36 (Peiser et al., 2002), ou les récepteurs de la famille des lectines tel le récepteur MMR (Macrophage-Mannose Receptor), DEC-205, la langerine, ou encore DC-SIGN (Engering et al., 2002; Valladeau et al., 2000). (Figure 2).

II.1.2 La phagocytose

C'est un processus dépendant de l'actine capable d'internaliser de larges particules ou pathogènes ($\geq 1\mu\text{m}$). Bien que les propriétés de phagocytose des DC soient faibles par rapport à celles des macrophages, elles sont dotées de différents récepteurs leur permettant de reconnaître et d'internaliser un matériel très divers. Ainsi, les cellules apoptotiques ou nécrotiques sont phagocytées via les récepteurs au complément, la molécule de surface CD14, les intégrines $\alpha\beta 3$ et $\alpha\beta 5$, ou les récepteurs de type scavenger comme CD36 ou CD68 (Albert et al., 1998; Berard et al., 2000; Subklewe et al., 2001). La phagocytose permet aussi l'internalisation de complexe immuns (Fanger et al., 1996) ou de pathogènes (Blank et al., 1993; Inaba et al., 1993). (Figure 2).

II.1.3 La macropinocytose

La macropinocytose est très développée chez la DC. Elle est constitutive et permet l'endocytose non spécifique et illimitée d'antigènes solubles (Norbury et al., 1997; Swanson and Watts, 1995). Elle permet de filtrer les liquides extra-cellulaires et de capturer les antigènes solubles même s'ils sont présents en faible quantité. Ce mécanisme est dû en partie à l'expression d'aquaporines (de Baey and Lanzavecchia,

2000). Comme la phagocytose, ce phénomène est aussi dépendant de l'actine et conduit à la formation de larges vacuoles intra-cellulaires (des macropinosomes) (Norbury, 2006; Sallusto et al., 1995). (Figure 2).

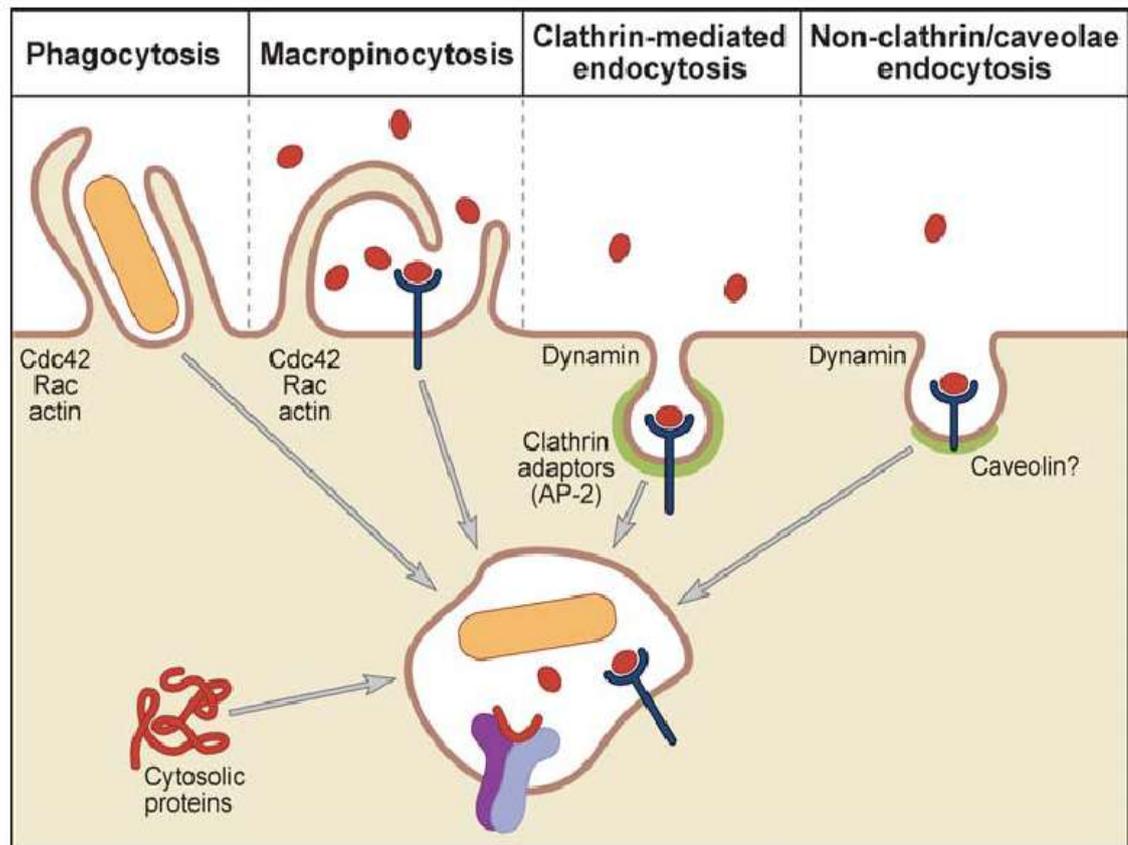


Figure 2 : Les voies principales utilisées pour la capture antigénique. (D'après (Trombetta and Mellman, 2005)).

II.2 L'activation des cellules dendritiques

L'invasion, chez tous les vertébrés, par des micro-organismes est initialement combattue par des mécanismes de défense innée qui préexistent chez tous les individus et sont activés dans les minutes qui suivent l'infection. Les macrophages, cellules dendritiques, cellules NK qui opèrent en première ligne de la réponse innée sont activés par des motifs moléculaires conservés au sein de différents types de micro-organismes baptisés PAMP (pathogen associated molecular pattern) par Charles Janeway (Janeway,

1989). Ces PAMP sont caractérisés par les trois propriétés suivantes : (a) ils sont absents des cellules de l'hôte ; (b) ils sont communs à de nombreuses espèces de micro-organismes ce qui permet de reconnaître l'énorme diversité des microbes par un nombre restreint de récepteurs ; (c) ils sont essentiels à la survie des micro-organismes, ce qui limite l'apparition de mutants échappant à la reconnaissance.

II.2.1 Les Toll-like Récepteurs (TLR)

II.2.1.1 Découverte

Le nom de TLR vient de l'homologie avec une famille de molécules retrouvée chez la drosophile *Drosophila melanogaster*, dont le principal membre est Toll. Chez la drosophile, Toll a initialement été identifié comme un gène important lors de l'embryogenèse, et en particulier, lors de la mise en place de l'axe dorso-ventral (Lemaitre et al., 1996). En 1996, Jules Hoffmann et son équipe montre que Toll participe à l'immunité anti-fongique chez la drosophile (Hoffmann et al., 1996). A l'époque de cette découverte, les TLRs sont connus chez les mammifères grâce à l'identification chromosomique de TIL (maintenant appelé TLR1) en 1996 par l'équipe de Taguchi (Taguchi et al., 1996). A l'époque, étant donné ce qui est connu de Toll chez la drosophile, des hypothèses avancent un rôle de TIL dans le développement embryonnaire des mammifères. Par ailleurs, une autre molécule avec un rôle évident dans l'immunité des mammifères, le récepteur à l'interleukine 1 (IL-1R) a au préalable été décrite par Nick Gay en 1991 et en particulier, l'homologie du domaine cytoplasmique avec celui de Toll (Gay and Keith, 1991).

Charles Janeway et ses collaborateurs identifient un second paralogue TLR en 1997 qu'ils appellent « h-Toll » (maintenant TLR4) (Medzhitov et al., 1997). En reprenant les travaux d'Hoffman, ils suggèrent que chez les mammifères, h-Toll pourrait « activer l'immunité adaptative ». La fonction précise de TLR4 est découverte en 1998 par le groupe de Bruce Beutler qui, par l'utilisation d'une technique génétique appelée « clonage positionnel », prouvent le rôle de TLR4 en tant que récepteur du lipopolysaccharide bactérien (connu également comme « endotoxine » ou LPS). Jusqu'alors, le LPS était connu depuis plus de cent ans pour ses puissants effets inflammatoires et immunomodulateurs. En étudiant les conséquences de la perte de ce TLR chez des souris invalidées pour le TLR, Beutler conclue que chez les mammifères,

chaque TLR pourrait reconnaître une molécule bien particulière témoignant d'une infection en cours.

Il apparaît maintenant que cette proposition était correcte et que les TLR représentent chez les mammifères des protéines clés permettant de détecter une infection et de déclencher la réponse immune.

II .2.1.2 Implication des TLR dans la reconnaissance des pathogènes

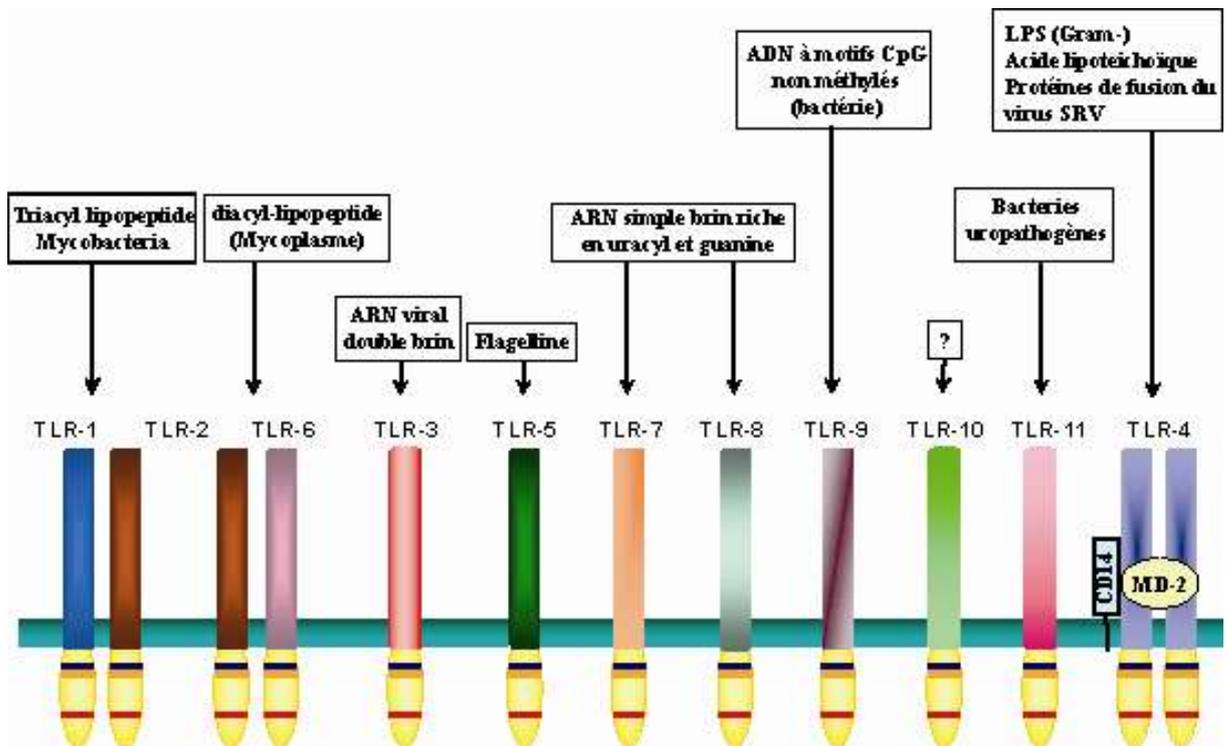


Figure 3 : Les TLR et leur ligands d'après (Akira and Takeda, 2004)

Les TLRs (récepteurs Toll-like) appartiennent à la grande famille des PRRs (Akira, 2006); (Akira and Takeda, 2004) (Pattern Recognition Receptors). En tant que tels, ils interviennent au cours des mécanismes de l'immunité innée en reconnaissant des motifs moléculaires conservés chez les pathogènes, les PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns). Ces motifs sont d'origine très diverses (bactéries, virus, parasite) et de nature variée (protéine, saccharide, acide nucléique) (Akira, 2006).

La plupart des espèces de mammifères ont entre dix et quinze types de TLRs. Treize TLRs (appelés simplement TLR1 à TLR13) ont été identifiés chez l'homme et la souris

tandis que de formes équivalentes ont été trouvées chez d'autres espèces (Baccala et al., 2007). Cependant, certains TLRs sont spécifiques de l'homme. Par exemple, un gène codant un analogue de TLR 10 chez l'homme est présent chez la souris mais semble avoir été endommagé dans le passé par un rétrovirus (pseudogène). La souris exprime par contre TLR11, TLR12 et TLR13, TLRs inexistant chez l'homme (Akira, 2003).

Plusieurs membres de la famille des TLRs sont aujourd'hui caractérisés. Un même TLR peut reconnaître différents ligands (Reis e Sousa, 2004).

Le **TLR1** joue un rôle de corécepteur et s'associe au TLR2 suite une stimulation par des lipopeptides (Yamamoto et al., 2002).

Le **TLR2** reconnaît une très grande variété de micro-organismes. Il reconnaît les lipoprotéines des pathogènes tels que les bactéries Gram négatives, les mycoplasmes, les spirochètes et l'acide lipotéichoïque des bactéries Gram positives, et les glycoprotéines virales (Alors que la plupart des TLRs sont des homodimères, TLR2 a la particularité de s'associer en hétérodimère avec TLR1 ou TLR6, permettant respectivement la reconnaissance de lipopeptides triacyl ou diacyl (Takeuchi et al., 2002).

Le **TLR3** reconnaît les ARN doubles brins qui sont produits par des virus en répliation (Alexopoulou et al., 2001); (Schulz et al., 2005). Ce TLR peut être stimulé aussi avec un ARN double brin synthétique appelé Poly (P : C).

Le **TLR4** est capable de reconnaître l'acide lipoteichoïque provenant de *Mycobacterium tuberculosis* (Gram⁺) (Means et al., 1999), la protéine du virus RSV (Respiratory Syncicial Virus) (Kurt-Jones et al., 2000), ainsi que le LPS (Lipopolysaccharide) (Dunzendorfer et al., 2004). Le mécanisme d'activation par le LPS est complexe et fait intervenir plusieurs molécules. Tout d'abord, le LPS est transporté par une protéine chaperonne plasmique, le LBP (LPS binding protein) qui va reconnaître la molécule CD14, située à la surface de certains types cellulaires. En effet, la molécule CD14 est caractéristique de la lignée monocytes-macrophage mais son ancrage membranaire la rend aisément soluble lui permettant de se trouver sur d'autres cellules comme les DC, les cellules endothéliales ou épithéliales. La cellule ayant acquis ce complexe (LPS/LBP, CD14) sera activée après interaction avec le MD2, une autre molécule de surface et le TLR4 (da Silva Correia et al., 2001).

Le **TLR5** reconnaît la Flagelline qui est un des constituant principaux du flagelle des bactéries Gram- (Hayashi et al., 2001; Means et al., 2003; Smith et al., 2003).

Le **TLR6** joue un rôle de co-récepteur du TLR2. Comme pour le TLR1, il s'associe au TLR2 suite à une stimulation par des lipopeptides.

La famille des **TLR7** et **TLR8** est associée aux réponses antivirales et à la production d'IFN- α (Hemmi et al., 2002). Ces deux TLR reconnaissent la molécule synthétique de type imidazoquinoline ;(ayant un puissant effet antiviral se lie à ces récepteurs)et ses dérivant R848 et imiquimod, les analogues de la guanosine tels que la loxoribine, les ARN simple brin (ssRNA) dérivés de certains virus comme le VIH de type 1 et certains siRNA de micro-organismes (Jurk et al., 2002; Lund et al., 2003; Cornelie et al., 2004; Diebold et al., 2004). Le **TLR9** reconnaît les motifs CpG de l'ADN microbien et engendre également une stimulation de la réponse immune (Medzhitov, 2001). Les CpG non méthylés de l'ADN se lient au TLR9 dans les endosomes, contrairement au TLR1, 2 et 4 qui reconnaissent leur ligand à la surface cellulaire (Bauer and Wagner, 2002; Wagner, 2004). Il existe deux principaux types de CpG : le CpG de type B induit une importante production des cytokines inflammatoires comme l'IL-12 et le TNF- α alors que le CpG de type A, de structure différente, induit une production importante d'IFN- α par les cellules dendritiques plasmacytoides mais peu d'IL-12 (Krug et al., 2001a; Verthelyi et al., 2001).

Le TLR10, sa séquence présente une grande homologie avec le TLR1 et le TLR6 (Dunne and O'Neill, 2003; Sanghavi et al., 2004). Chez l'homme, il a été montré que ce récepteur est exprimé au niveau des lymphocytes B et des pDC (Hasan et al., 2005). Son ligand spécifique reste encore mal connu.

Le **TLR11** a été récemment mis en évidence chez la souris. Ce récepteur est exprimé particulièrement dans le foie et les reins (Zhang et al., 2004). Son seul ligand identifié est la PLP (proliferin – like protein) (Lauw et al., 2005; Yarovinsky et al., 2005). Ce récepteur serait impliqué dans la reconnaissance des bactéries uropathogènes.

Les TLR sont différentiellement exprimés selon les populations de DC et selon leur état de maturation. De plus, ils sont exprimés par d'autres cellules qui contribuent aux réponses inflammatoires, comme les macrophages, les monocytes (Muzio et al., 2000), les mastocytes (McCurdy et al., 2001) (Supajatura et al., 2001). D'autres études ont aussi analysé l'expression des TLR dans différents tissus (Zarembek and Godowski, 2002). Ces études indiquent que la plupart des tissus expriment au moins un TLR. Les TLR sont exprimés dans plusieurs autres types de cellules contribuant aux réponses

inflammatoires telles que les cellules des épithéliums respiratoires (Wang et al., 2002), intestinaux (Hacker et al., 1998) (Abreu et al., 2001) et rénaux (Wolfs et al., 2002).

De plus les TLR sont différenciellement distribués au sein des cellules (**Figure 4**). Les **TLR1, 2, 4, 5, 6** sont exprimés à la **surface cellulaire** alors que les **TLR3, 7, 8 et 9** sont exprimés dans les **compartiments intracellulaires comme les endosomes** (Trinchieri and Sher, 2007).

La reconnaissance des ligands des TLR3, 7, 9 nécessite la maturation endosomiale (Hacker et al., 1998; Heil et al., 2004). En effet, dans le cas d'une infection virale, les virus envahissent la cellule suite à une endocytose et les virus sont exposés au cytoplasme par fusion de la membrane virale aux endosomes. Cette fusion aux endosomes permet l'exposition des composés viraux et la reconnaissance de ces derniers par notamment le TLR9.

Les TLR permettent aux DC de reconnaître les pathogènes internalisés ou présents dans le milieu extracellulaire. Cependant de nombreux types de PRRs sont exprimés à la surface cellulaire : les C-type lectin like molécules, tels que mannose receptor et β -glucan receptor (par exemple, dectin-1) qui participent à l'engagement et à la capture des composants microbiens.. Néanmoins, les DC doivent aussi être capables de réagir face aux pathogènes qui se sont introduits dans leur cytosol. Deux familles de PRRs sont alors impliquées, la famille des NLR (Nucleotide-binding Oligomerization Domain NOD- like receptor family), qui contient au moins 23 membres qui sont soit NOD receptor ou NALPs (NACHT-, LRR- and pyrin domain containing proteins) et la famille des récepteurs ayant les hélicases à ARN (CARDs) (Caspase Activation and Recruitment Domain), tels que RIG-1 (retinoic-acid-inducible gene I) et MDA5 (melanoma-differentiation associated gene 5). Une autre petite famille de récepteurs proposée par Creagh et O'Neill, les RLR (RIG-I-like receptor) qui s'ajoute au Familles des TLR et NLR (Figure 4) (Akira, 2006; Inohara et al., 2005; Bourhis and Werts, 2007; Trinchieri and Sher, 2007).

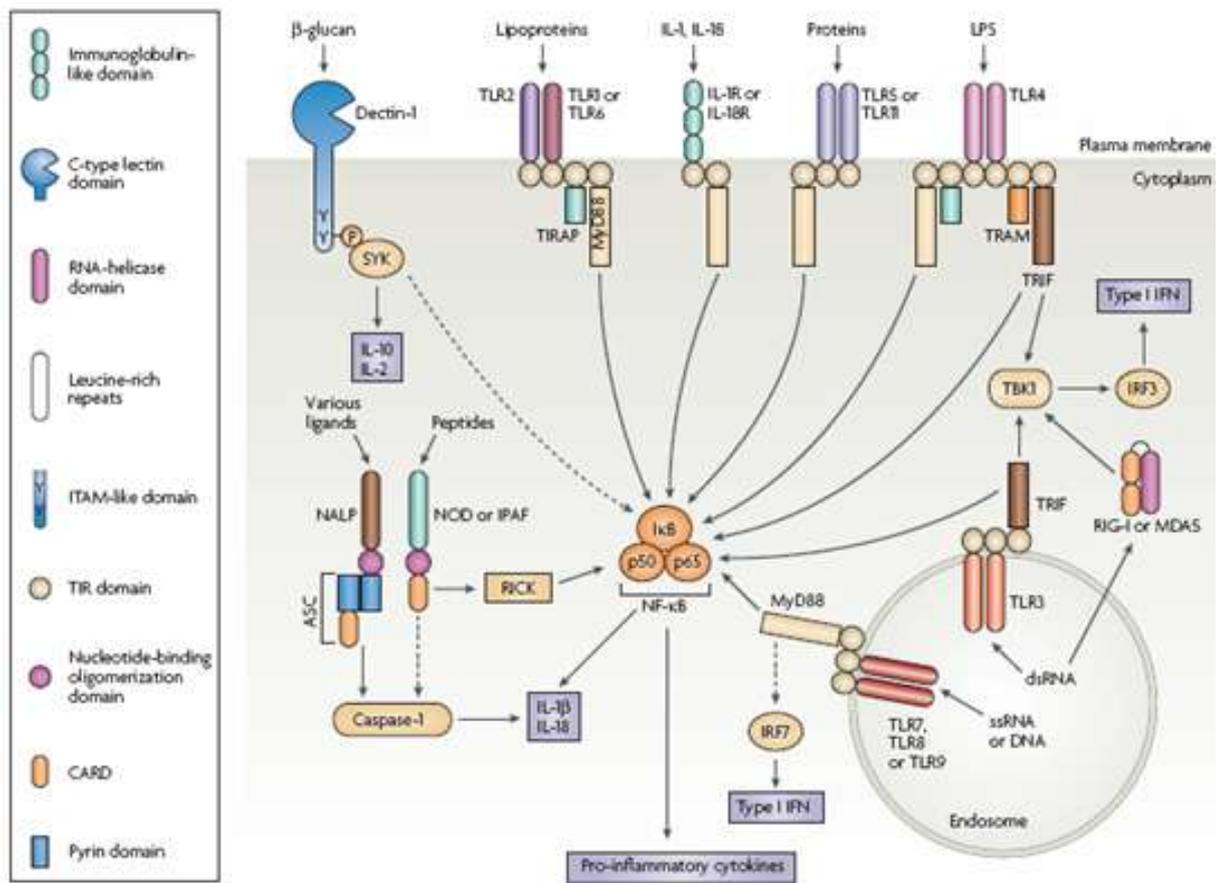


Figure 4 : Schéma représentatif de la structure et des voies de signalisation des différentes familles des PRR (Trinchieri and Sher, 2007)

II.2.1.3 Les voies de signalisation des TLR

Les TLR possèdent un domaine intracellulaire commun au récepteur de l'IL-1 (**TIR** : Toll/IL-1 Receptor) (Reis e Sousa, 2004). Les voies de signalisation des TLR passent par différents types de protéines adaptatrices dont MyD88, IRAK (IL-1R Associated Protein Kinase), TRAF6 (Tumor Necrosis Factor Receptor- Activated Factor 6), et TIRAP impliquées dans la transduction du signal des TLR (Figure 4) et la TOLLIP (Toll- Interacting Protein) (Akira et al., 2001; Kobayashi et al., 2004; Liu et al., 2005).

Deux voies de signalisation sont décrites, une faisant intervenir la protéine MyD88 et une MyD88-indépendante. Lors de la voie MyD88 dépendante, les protéines adaptatrices sont activées suite à l'interaction du TLR avec son ligand. La TOLLIP interagit avec le TIR et entraîne l'activation de la protéine MyD88, nécessaire pour le

recrutement de la protéine IRAK. La phosphorylation de l'IRAK entraîne le recrutement de la protéine TRAF6. La formation de ce complexe aboutit à la phosphorylation puis à la translocation du facteur NF- κ B, qui joue un rôle important dans la production des cytokines proinflammatoires et l'induction de la maturation des DC.

Dans le cas de la stimulation via le TLR3, 5, 7, 8,9, c'est l'interaction directe de la protéine MyD88 avec le domaine du TLR, qui est responsable de l'activation des autres protéines adaptatrices.

L'étude des voies de transduction a été réalisée dans plusieurs modèles expérimentaux notamment en utilisant des souris déficientes en MyD88. Ainsi, l'injection d'antigènes+ adjuvant de Freund à des souris déficientes en MyD88 ne permet ni l'activation des lymphocytes T, ni la maturation des DC observées chez des souris normales (Schnare et al., 2001).

La voie MyD88 indépendante, a été découverte dans les cellules MyD88 KO qui pouvaient toujours répondre au LPS via leur TLR4 sans production de molécules proinflammatoires (Kawai et al., 1999). Cette voie indépendante du MyD88, dans le cas du LPS, induit aussi une augmentation des molécules de costimulation et des molécules du CMH à la surface des DC mais n'induit pas la sécrétion des cytokines (Kaisho et al., 2001). Cette voie est déclenchée par la stimulation du TLR4 ou du TLR3, et fait intervenir les facteurs de transcription IRF (Interferon Regulatory Factor) et NF κ B (Kawai et al., 2001). La cascade de signalisation passe par un adaptateur au domaine TIR : TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β) qui va activer une cascade de MAP-Kinases (Yamamoto et al., 2003). La reconnaissance des composants microbiens entraîne l'activation de la DC et la production de cytokines inflammatoires.

II.2.1.4 Autres facteurs activant les cellules dendritiques

Le modèle du danger proposé par Matzinger suggère que les DC sont activées après détection des signaux de danger libérés par les cellules périphériques stressées, endommagées ou nécrosées (Matzinger, 1994). Ces signaux de danger constitutifs, intracellulaires dont les mieux caractérisés sont diverses protéines de type HSP « heat shock protein » (soit intra cytoplasmique comme HSP60, HSP70, HSP90 ou intranucléaires comme gp96). Outre leurs fonctions de protéines chaperonnes, les HSPs représentent des transporteurs non spécifiques de peptides (sauf pour l'HSP60), elles peuvent être libérées dans l'environnement en cas de lyse cellulaire.

Depuis peu, il a été démontré que les HSPs n'étaient pas seulement une source de peptide capable de charger le compartiment des molécules du CMH de classe I des CPA mais également des activateurs endogènes de ces CPA. C'est le cas de l'HSP60 qui active le TLR4 de façon analogue au LPS (Ohashi et al., 2000) ou le groupe HSP70, HSP90 qui activent les macrophages et les DC via un récepteur identifié, CD91 (Basu et al., 2001).

L'hypothèse est ainsi émise que les HSP pourraient constituer des inducteurs de l'immunité innée, capables d'alerter précocement le système immunitaire adaptatif d'un danger. L'étude de Rovere et al. a montré que les cellules apoptotiques peuvent induire la maturation des DC (Rovere et al., 1998). Ces résultats sont controversés et il a été montré plus tard que les cellules en nécrose, contrairement aux cellules apoptotiques, induisent la maturation des DC (Sauter et al., 2000).

Les signaux pro-inflammatoires délivrés par les cellules avoisinantes peuvent entraîner un « stress biologique » et par conséquent une maturation des DC. Par exemple, les kératinocytes peuvent produire L'IL-1, L'IL18 et le TNF α et activer les DC résidentes (Lebre et al., 2003).

Aussi, le CD40L impliqué dans la phase finale de l'activation des DC lors du contact des lymphocytes avec les DC est exprimé par d'autres cellules comme les mastocytes, les basophiles, les plaquettes qui seraient à l'origine d'une activation de DC immatures (Elzey et al., 2003; Kaneider et al., 2003).

Au total, tout le système immunitaire adaptatif est mis en action via les DC par des signaux d'alarmes de différentes formes provenant des cellules stressées, abîmées ou infectées.

III. Les cellules dendritiques : cellules initiatrices et régulatrices de la réponse adaptative

III.1 Apprêtement antigénique

Après phagocytose par les cellules dendritiques, les agents microbiens et les antigènes sont dégradés en peptides qui sont ensuite couplés aux molécules du CMH, et exprimés sur la membrane cellulaire, afin d'être présentés spécifiquement aux lymphocytes T (Brodsky and Guagliardi, 1991). Les molécules du CMH sont codées par un ensemble de loci regroupés en deux classes, les molécules du CMH de classe I et les molécules de classe II. Ces complexes portent différents noms selon l'espèce, on

parle en effet de HLA chez l'homme, de H2 chez la souris et de RT1 chez le rat. L'apprêtement des antigènes a lieu dans des compartiments cellulaires différents selon qu'il s'agit d'une présentation par les molécules du CMH de classe I ou les molécules du CMH de classe II (Germain et al., 1986).

III.1.1 Le CMH de classe I

Les molécules du CMH de classe I sont exprimées de façon constitutive, à des niveaux variables, à la surface de toutes les cellules nucléées. Les molécules du CMH de classe I consistent en l'association non covalente entre une chaîne lourde, codée par exemple chez la souris par les gènes H2-K ou H2-D, et la β 2-microglobuline (β 2m). Chaque molécule du CMH de classe I présente un peptide de faible taille (8 à 10 mers) provenant de la dégradation d'une protéine endogène (Germain and Margulies, 1993). Les protéines antigéniques endogènes après ubiquitination sont dégradées par le protéasome et diverses peptidases (Trombetta and Mellman, 2005). Les peptides générés accèdent alors via le transporteur TAP (Transporter associated with Antigen Processing) au réticulum endoplasmique. Là, ils sont clivés par la protéase ERAAP (Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase Associated with Antigen Processing ou ERAP 1) en peptides de 9 à 10 acides aminés qui seront apprêtés sur les molécules du CMH I (Serwold et al., 2002) (Figure 5).

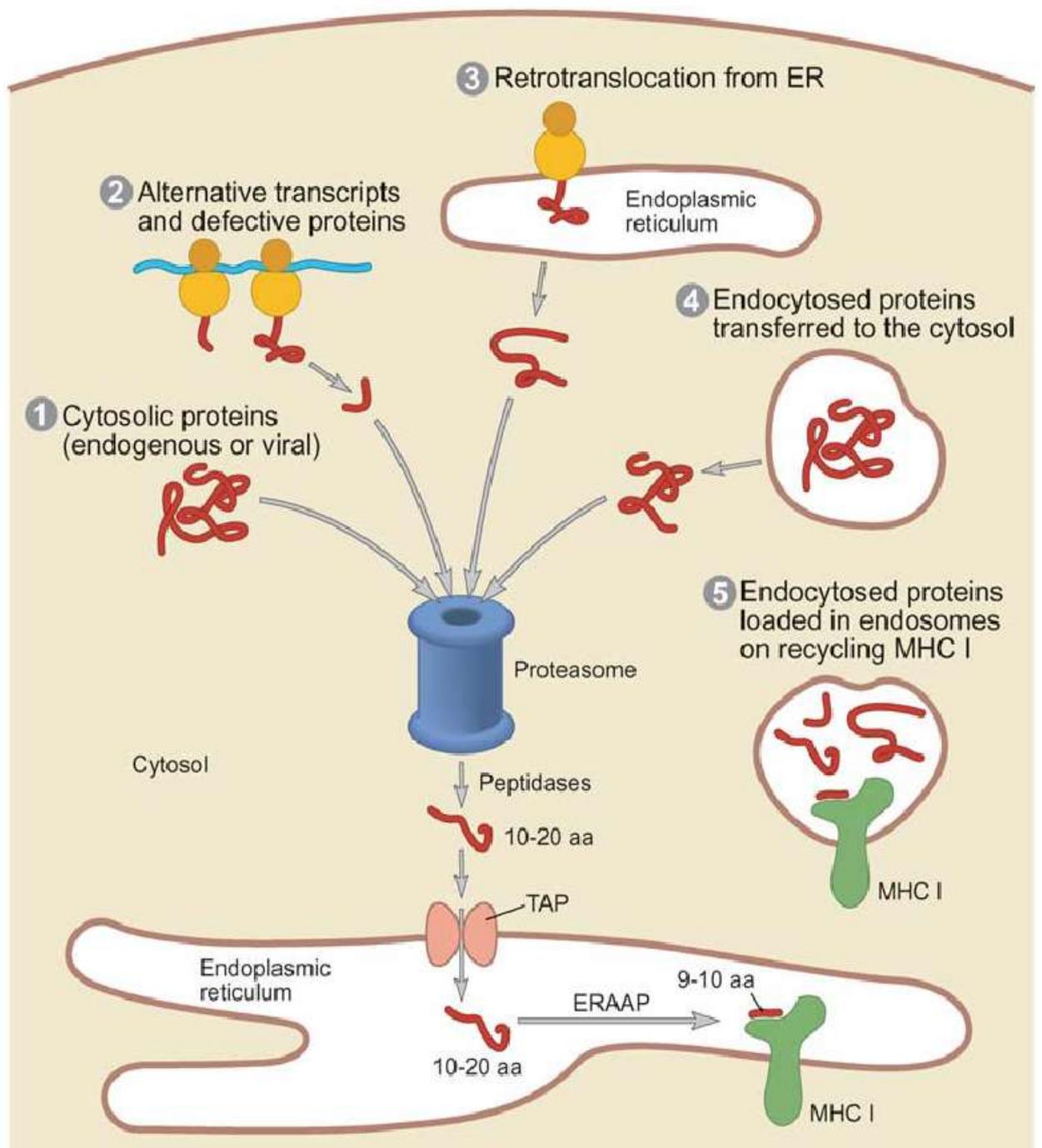


Figure 5 : Les voies d'accès au CMH de classe I. (D'après (Trombetta and Mellman, 2005)).

Le CMH de classe I est spécialisé dans la présentation de peptides endogènes. Cependant les DC sont également capables de présenter des peptides exogènes internalisés sur le CMH I grâce au processus de présentation croisée (Albert et al.,

1998). Cette voie est quantitativement moins importante que la présentation endogène. Elle est néanmoins essentielle pour générer une réponse lymphocytaire TCD8 contre les cellules tumorales ou les pathogènes qui n'infectent pas les DC. IL est intéressant de noter que suite à l'activation des DC, la synthèse et la demi vie des molécules du CMH I sont augmentées et que contrairement aux molécules de CMH II, le renouvellement des molécules de CMH I est continu même dans les DC matures (Rescigno et al., 1998).

III.1.2 Le CMH de classe II

L'expression des molécules du CMH de classe II est restreinte aux CPA (DC, macrophage, lymphocytes B, ou encore les cellules épithéliales du thymus). Les peptides présentés sur le CMH de classe II sont principalement issus d'antigènes exogènes internalisés par phagocytose, macropinocytose ou endocytose (Figure 2). Le chargement sur le CMH II pourrait alors se faire dans les endosomes tardifs ou lysosomes. Les enzymes lysosomiales contenues dans ces vésicules assurant alors le découpage des protéines avant leur chargement sur le CMH II (Neijssen et al., 2005). Néanmoins, les protéines endogènes cytosoliques ont aussi accès aux lysosomes et donc au chargement sur le CMH II.

La présentation des antigènes sur le CMH de classe I ou CMH de classe II peut être régulée selon différentes modalités. Par exemple, l'internalisation via le récepteur DEC-205 améliore la présentation des antigènes (Bonifaz et al., 2004) et le ciblage de Lox-1 par des HSP Heat Shock Protein) favorise la présentation croisée (Delneste et al., 2002). Elle peut aussi être régulée quantitativement, au cours de la maturation des DC, par une synthèse de protéases et de molécules du CMH (Cella et al., 1997; Rescigno et al., 1998) et qualitativement, par génération de nouveaux épitopes par l'immunoprotéasome (Chapiro et al., 2006).

III.1.3 La présentation croisée

La présentation de matériel antigénique exogène se fait classiquement via les molécules de CMH de classe II, mais il existe une voie alternative propre aux DC qui permet de présenter des peptides exogènes sur des CMH de classe I, c'est la cross-présentation ou présentation croisée. Le concept a été proposé pour la première fois par Bevan qui observa une réponse CTL dirigée contre des antigènes de cellules injectées.

Bevan proposa que des peptides exogènes pouvaient être présentés in vivo à la surface des molécules CMH I entraînant ainsi des réponses CTL spécifiques. Il nomma cette voie « présentation croisée » (Bevan, 1976). Les CPA vont donc acquérir des antigènes de cellules tumorales ou infectées, ou de microbes qui n'ont pas infecté la DC et qui ont pu être internalisés par macropinocytose, phagocytose ou opsonisation (Guermonprez et al., 2002). Elles vont pouvoir les présenter sur leur propres molécules de CMH I aux cellules T CD8+ (den Haan and Bevan, 2002).

Le mécanisme de la présentation croisée repose principalement sur deux phénomènes biologiques :

- **Voie TAP dépendante** : Les antigènes présents dans les endosomes vont subir une translocation, par un moyen de transport exclusif vers le cytosol (Kovacsovic-Bankowski and Rock, 1995; Rodriguez et al., 1999). Ainsi, les antigènes capturés peuvent rejoindre les antigènes endogènes et suivre la voie classique de l'apprêtement du CMH de classe I (décrite ci-dessus).

- **Voie TAP indépendante** : semble due à un échange de peptides chargés dans les molécules du CMH de classe I avec les antigènes exogènes au cours du recyclage de la molécule du CMH de classe I (Gromme et al., 1999). Cette étape s'effectue au niveau des endosomes et le complexe retournerait directement à la membrane sans passer par les protéasomes. Cependant, les peptides échangés et donc présentés à la surface n'ont pas subi une étape de dégradation par les protéasomes ce qui pourrait poser un problème de spécificité lors de la présentation.

La présentation croisée concerne les cellules mortes et en particulier les cellules apoptotiques (Li et al., 2001). Elle concerne aussi un nombre assez important d'antigènes comme les différents composants bactériens (Jeannin et al., 2000), des complexes immuns reconnus par le fragment Fc (Regnault et al., 1999), les antigènes associés aux HSPs (Heat Shock Protein) (Arnold et al., 1997) et aux exosomes (Wolfers et al., 2001).

Enfin, la présentation croisée joue un rôle important dans l'immunité (Sigal and Rock, 2000) ainsi que dans le maintien de la tolérance centrale (von Boehmer and Hafen, 1986) et périphérique (Forster and Lieberam, 1996 ;Kurts et al., 1996).

III.1.4 Le CD1

Outre les molécules du CMH de classe I et du CMH de classe II, les DC expriment une troisième classe de molécules impliquées dans la présentation d'antigène : les molécules CD1 (Gillessen et al., 2003). Ces molécules sont apparentées aux molécules du CMH de classe I. Elles sont non polymorphiques et s'associent de manière non covalente à la molécule β 2-m (Jones et al., 1991). Chez l'homme, on distingue cinq gènes codant pour ces molécules de classe I non classiques (Guermontprez et al., 2002; Yu and Milstein, 1989) : CD1a, b, c, d, e. Par homologie de séquence, les CD1a, b, c ont été définis comme constituant le groupe 1. Chaque molécule est impliquée dans la surveillance d'un compartiment endosomal spécifique : CD1a pour les endosomes précoces et de recyclage, CD1b pour les lysosomes, et CD1c vraisemblablement pour tous les compartiments. L'association du CD1b et du CD1c avec l'antigène peut se faire directement à la surface de la DC. La dernière isoforme des molécules CD1, la molécule CD1e n'est pas exprimée à la surface des cellules. Elle s'accumule dans l'appareil de Golgi et est relocalisée dans les endosomes tardifs au cours de la maturation des DC. Chez la souris, un seul gène homologue est identifié : CD1d (Bollyky and Wilson, 2004). La molécule CD1d est synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique. L'association CD1/antigène se fait principalement dans les compartiments de la voie endocytaire. La queue cytoplasmique du CD1d, contenant quatre acides aminés (Tyrosine- Glutamine- Acide aspartique- isoleucine), semble nécessaire pour sa localisation endosomiale et sa fonction de présentation d'antigènes (Lawton et al., 2005). Dans ces compartiments, les molécules CD1d participent à l'apprêtement des antigènes glycolipidiques aussi bien d'origine endogène qu'exogène (Prigozy et al., 2001). Le mécanisme exact de la voie de présentation par les molécules CD1d reste encore à établir.

La voie de présentation par les molécules du CD1d est impliquée dans les réponses immunitaires adaptatives (Nishimura et al., 2000), dans l'auto-immunité (Blumberg, 2001; Naumov et al., 2001), dans l'immunité anti-tumorale (Gillessen et al., 2003) et dans le maintien de la tolérance au soi (Racke et al., 2002).

Par ailleurs, la molécule CD1d, chez l'homme ainsi que chez la souris peut s'associer à l' α -galactosyl-céramide, un antigène synthétique qui active une sous population particulière de lymphocytes T, les lymphocytes T NK (Guermontprez et al., 2002). Nous verrons plus loin son rôle, plus ou moins clair, dans le maintien de la tolérance médiée par les cellules T NK.

III.2 Maturation et Migration des cellules dendritiques

III.2.1 La maturation des cellules dendritiques

Par convention, les DC résidentes en périphérie sont dans un état immature du fait de leur faible capacité à stimuler les lymphocytes T et de leur grande capacité de capture antigénique. Suite à la capture d'antigènes, les DC immatures vont subir un programme de maturation complexe qui va leur permettre d'avoir des capacités uniques à activer les lymphocytes T naïfs, et dont les éléments essentiels sont :

- i) Leur migration du lieu qu'elles occupent vers les organes lymphoïdes secondaires (Clark et al., 2000).
- ii) Une transformation morphologique caractéristique avec diminution de leur capacité de captures d'antigènes (Sallusto et al., 1995). Ce changement morphologique se caractérise aussi par une perte des structures adhésives, une réorganisation du cytosquelette entraînant la formation de dendrites et l'acquisition d'une forte mobilité cellulaire (Tang et al., 1993; Banchereau and Steinman, 1998).
- iii) La stabilisation et la présentation d'un grand nombre de complexe CMH/peptide à leur surface (Cella et al., 1997). En effet, à l'état de repos, les molécules du CMH sont recyclées en permanence de la surface vers les compartiments endosomaux pour revenir en surface chargées de nouveaux peptides. La maturation interrompt l'endocytose, favorisant ainsi une présentation antigénique massive et de longue durée.
- iv) Une expression en abondance des molécules de costimulation RANK, CD40, CD58, CD80 et CD86 indispensables pour l'activation des lymphocytes T naïfs (Banchereau and Steinman, 1998; Carreno and Collins, 2002).
- v) La sécrétion d'un ensemble de cytokine, très limitée dans le temps, dont la diversité va dépendre du stimulus initial (Steinman et al., 2003).

III.2.2 La migration des cellules dendritiques

Les lymphocytes T naïfs sont incapables d'accéder aux tissus périphériques, leur localisation est limitée à la circulation sanguine et aux organes lymphoïdes secondaires (von Andrian and Mackay, 2000). Une fois que les DC ont capturé l'antigène, elles migrent vers les organes lymphoïdes secondaires pour les présenter aux cellules T.

III.2.2.1 Les chimiokines

La migration dépend de molécules solubles appelées : **chimiokines**, et de l'expression relative de leurs récepteurs spécifiques. En effet, les chimiokines jouent un rôle dans la régulation du trafic des leucocytes et notamment des DC. Chaque sous-population de DC possède des propriétés migratoires qui lui sont propres, et qui peuvent varier en fonction de son stade de maturation et d'activation. Cette flexibilité est possible grâce à la multiplicité des chimiokines et de leurs récepteurs.

Les chimiokines sont des protéines solubles de faible poids moléculaire (8-14kD), qui possèdent en général 4 cystéines conservées. On distingue quatre familles de chimiokines selon le nombre d'acides aminés séparant les deux premières cystéines : **Les CC chimiokines** jouent un rôle important dans la migration des cellules de l'inflammation, chacune étant spécifique d'un nombre limité de leucocytes. Elles sont aussi impliquées dans la migration des DC. **Les CXC chimiokines**, essentiellement impliquées dans la migration des neutrophiles et les lymphocytes. Et les chimiokines C et les chimiokines CX3C (Laing and Secombes, 2004; Rossi and Zlotnik, 2000).

La nature des chimiokines produites varie selon l'endroit de l'organisme, selon l'état inflammatoire et selon la cause inflammatoire. Cette flexibilité permet de recruter, localement, exclusivement les cellules qui expriment le récepteur du chimiokine correspondant, et qui ont la fonction la plus adaptée à la situation du tissu au moment où s'effectue ce recrutement. Enfin, il existe d'autres **facteurs chimiotactiques** « **non chimiokines** » comportant les récepteurs des composants bactériens, des lipides bioactifs et certains peptides qui jouent un rôle important dans les réponses immunitaires rapides (Sozzani, 2005).

La migration des DC est intimement liée à leur maturation. En effet, suite à une maturation des DC par l'injection de LPS, il s'en suit une migration des DC des tissus vers les organes lymphoïdes (MacPherson et al., 1995; Reis e Sousa and Germain, 1999). Ainsi, les DC activées vont subir un processus de maturation au cours de leur

migration qui s'accompagne par une diminution progressive de certains récepteurs de chimiokines que les DC exprimaient dans leur état immature. Par ailleurs, les DC matures et immatures peuvent suivre un même trajet migratoire en réponse à différentes chimiokines (Sozzani et al., 1998).

III.2.2.2 Expression des récepteurs de chimiokines

Après l'entrée des précurseurs de DC dans les tissus et leur différenciation en DC immatures le profil des récepteurs des chimiokines est modifié. En périphérie, les précurseurs des DC expriment deux récepteurs de chimiokines : CCR2 et CXCR4 (Caux et al., 2000). Cependant, au cours de la différenciation, certains précurseurs de DC perdent leur capacité à répondre aux ligands du CCR2 et deviennent plus sensibles à l'action du CCL20 ce qui montre l'implication du CCR2 et ses ligands dans le mouvement initial des précurseurs de DC dans les tissus périphériques.

Chez l'homme, il a été montré que les DC issues in vitro de cellules souches CD34⁺ expriment le CCR6 contrairement aux cellules CD11C⁺ immatures ou aux DC dérivées des monocytes (Dieu et al., 1998). Zou et al ont montré que l'expression du CXCL12 par des cellules tumorales entraîne une forte accumulation de pDC dans la cavité péritonéale chez l'homme (Zou et al., 2001). Ces pDC entraînent l'activation de cellules T reg (T régulatrices) qui inhibent de façon spécifique la réaction immunitaire contre la tumeur. Aussi, il a été montré que les pDC et les monocytes du sang possédaient des profils migratoires différents alors qu'elles expriment de façon quasiment similaire les récepteurs aux chimiokines pro inflammatoires (Penna et al., 2001; Penna et al., 2002a; Penna et al., 2002b).

III.2.2.3 Production des chimiokines par les cellules dendritiques

Les DC produisent des chimiokines qui participent aux phénomènes de l'immunité adaptative et innée. En effet, après leur stimulation initiale, les DC immatures sécrètent des chimiokines comme le CXCL8, CXCL10, CCL3, CCL4 et CCL5 ce qui induit le recrutement des neutrophiles et des monocytes sur le site de l'infection.

Dans certains organes lymphoïdes secondaires, la capture des antigènes se fait par les DC immatures préexistantes sur le site. En effet, la migration des DC n'est pas observée uniquement en présence de signal de maturation et il a été montré que les DC migrent de manière constitutive vers les organes lymphoïdes secondaires (Kamath et al., 2000). Il a été montré chez le rat que la population de DC CD4⁻ contenant des corps apoptotiques de cellules épithéliales intestinales migrait constitutivement vers les ganglions drainant les intestins (Huang et al., 2000). Cela peut illustrer parfaitement le concept d'une circulation permanente de certaines sous-populations de DC vers les ganglions lymphatiques qui serait étroitement impliquée dans le maintien de la tolérance.

Il a été suggéré que la force majeure qui attire les DC dans les ganglions lymphoïdes secondaires est la production constitutive des CCL19 et du CCL21, par les cellules stromales présentes dans la zone des lymphocytes T (Sozzani et al., 1998). Le CCL21 est également exprimé par les cellules endothéliales des veinules ainsi que les cellules épithéliales des vaisseaux lymphatiques et permet la migration des DC dans le sinus capsulaire des ganglions drainant (Gunn et al., 1998) tandis que la CCL19 permet aux DC de les rejoindre dans les zones T des ganglions. Une fois dans les ganglions, les DC matures deviennent une source de CCL19 et CCL21, ce qui permet une amplification et une persistance du signal chimio-attractant (Sallusto et al., 1998).

III.3 L'activation des lymphocytes T

III.3.1 La mise en place de la synapse immunologique

La reconnaissance de l'antigène induit chez le lymphocyte T la réorganisation de la membrane plasmique du cytosquelette sous-jacent (Roumier et al., 2001). Il se forme alors à la jonction entre le lymphocyte T et la DC un contact étroit appelé « synapse immunologique » (Figure 4). La synapse immunologique s'organise en régions concentriques. La partie centrale appelée cSMAC (central Supramolecular Activation Cluster) comprend principalement le TCR, interagissant avec le CMH-peptide, et les molécules de costimulation. A la périphérie, se trouve la région pSMAC (peripheral Supramolecular Activation Cluster), composé des molécules d'adhésion notamment ICAM 1 (Intracellular Adhesion Molecule 1) et LFA-1 (Lymphocytes Function associated Antigen 1) (Friedl et al., 2005).

La synapse immunologique facilite la transmission efficace du signal d'activation aux lymphocytes T, et confère une stabilité à l'interaction du lymphocyte à la DC.

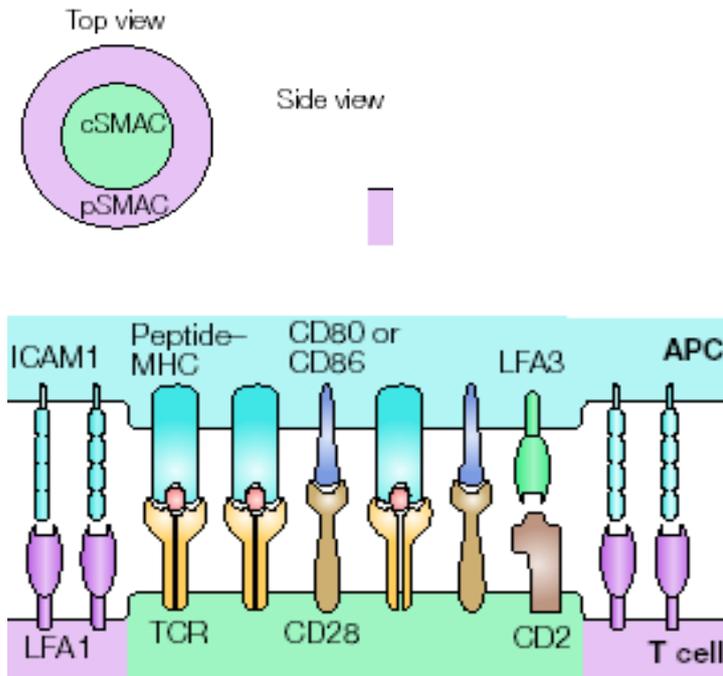


Figure 6 : La synapse immunologique (D'après (Friedl et al., 2005)).

III.3.2 Le signal de costimulation

L'interaction entre DC et lymphocytes T est un processus complexe et ordonné, qui fait intervenir de nombreux signaux membranaires ou solubles habituellement classés en 3 catégories. Le **signal 1** consiste en la reconnaissance par le lymphocyte via son TCR (T Cell Receptor) du complexe CMH-peptide porté par la DC (Matzinger, 1994). Seul, il ne permet pas l'activation des lymphocytes. Il doit être accompagné par un **signal 2**, produit par les molécules de costimulation exprimées par la DC et leurs ligands exprimés sur le lymphocyte, en particulier l'interaction des molécules de costimulation B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) exprimées par les DC et CD28, une glycoprotéine exprimée par les lymphocytes T (Cella et al., 1996; Creusot et al., 2002; Lanzavecchia, 1998). L'engagement du CD28 en synergie avec celui du TCR induit la sécrétion d'IL-2 (Shahinian et al., 1993; Lu et al., 1994). L'IL-2 facteur d'expansion et de différenciation agit de manière autocrine et paracrine, jouant un rôle essentiel dans la prolifération des T. Une fois activées, les cellules T expriment CTLA-4 (CD152) qui reconnaît les molécules B7 avec une affinité supérieure au CD28. CTLA-4 délivre un signal négatif à la cellule T activée, permettant une régulation de la réponse immune (Walunas et al., 1996; Lee et al., 1998). Une autre voie de costimulation d'importance

majeure est l'interaction CD40-CD40L (Cayabyab et al., 1994): CD40L est induit sur les cellules TCD4⁺ activées et permet en retour une activation de la cellule dendritique exprimant CD40 (Grewal and Flavell, 1996). Enfin, différentes réponses cytokiniques, conventionnellement décrites sous **signal 3**, vont participer à l'activation des lymphocytes et l'orientation de la réponse immunitaire (Kalinski et al., 1999; Langenkamp et al., 2002).

L'orientation de la réponse immunitaire dépend principalement du stimulus de maturation (de Jong et al., 2002; Mazzoni and Segal, 2004) mais aussi d'autres facteurs comme le type de DC impliquées (Rissoan et al., 1999), la cinétique de la maturation (Langenkamp et al., 2000), la concentration en antigène lors du chargement des DC (Boonstra et al., 2003); (Hosken et al., 1995) ou le ratio entre DC et lymphocyte T (Tanaka et al., 2000).

III.3.3 La différenciation des cellules TCD4⁺

Les cellules TCD4⁺, une fois activées par les CPA, vont activer de nombreuses cellules effectrices par l'intermédiaire de leur production de cytokines. Les précurseurs des cellules TCD4⁺ se différencient en différentes sous populations : Th1, Th2 et Th 17 (pour T « helper », ou T auxiliaire de type 1, 2 et 17) ou Treg (Hunter and Reiner, 2000; Steinman, 2007), mais nous verrons par la suite que les cellules T peuvent également se différencier en cellules régulatrices, telles que les cellules TH3, ou encore en cellules T régulatrices de type 1 (Tr1) (Chapitre V.3.2 Autres types de cellules régulatrices).

Les cellules TCD4⁺ helper effectrices Th1 produisent de grandes quantités d'IFN- γ et de TNF- β qui participent à l'immunité cellulaire contre les virus, les bactéries intracellulaires et les protozoaires, mais également dans les phénomènes d'hypersensibilité retardée. A l'inverse, les cellules effectrices Th2 produisent principalement de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-6, de l'IL-10 et l'IL-13 qui sont importantes dans la défense humorale contre les parasites, les helminthes et les nématodes, et sont également responsables de réactions allergiques. dans les réactions d'hyper sensibilité immédiate médiées par les IgE, et de manière générale dans les réactions d'hypersensibilité immédiate extracellulaire (Foronczewicz et al., 2002); Inobe et al., 1998).

De nombreuses expériences ont montré l'existence d'une balance Th1/Th2 qui permet une protection contre les agents pathogènes et le maintien des mécanismes de tolérance

périphériques. Le développement d'une réponse Th1 ou Th2 prédominante est très fortement affecté par les cytokines et les facteurs produits localement par les différentes cellules. Ainsi, la présence d'IL-4 lors du développement in vitro des lymphocytes T favorise le développement d'effecteurs sécrétant de l'IL-4 (Th2) et inhibe le développement de ceux sécrétant de l'IL-2 (Th1). In vivo, l'IL-4 produite par les cellules T de type Th2, les mastocytes, les basophiles et les T NK favorise le développement des cellules T naïves en cellules de type Th2, en induisant l'expression du facteur de transcription STAT-6 et en activant l'expression du récepteur de l'IL-4 (Dorado et al., 2002).

Durant la maturation des DC, ces dernières sécrètent de nombreuses chimiokines et cytokines contribuant à l'amplification de la réponse inflammatoire et de la réponse innée.

Chez la souris, les DC spléniques CD8⁺ orienteraient la différenciation des lymphocytes CD4⁺ naïfs vers un profil cytokinique de type Th1 (avec forte production d'IFN- γ) alors que les DC CD8⁻ orienteraient les lymphocytes CD4⁺ naïfs vers un profil Th2 (Maldonado-Lopez et al., 1999). Il a été suggéré que cet effet serait dû à une forte production d'IL-12 par les DC CD8⁺, contrairement aux DC CD8⁻ qui en produisent une faible quantité. Aussi chez la souris, les DC myéloïdes matures stimuleraient une réponse mixte ou de type Th2 alors que les DC lymphoïdes matures stimuleraient une réponse de type Th1 (Maldonado-Lopez et al., 1999; Pulendran et al., 1997; Reid et al., 2000). Bien que plusieurs cellules puissent produire de l'IFN- α , il apparaît que le type cellulaire qui en produit le plus abondamment après stimulation virale soit les pDC (Siegal et al., 1999; Asselin-Paturel et al., 2001; Diebold et al., 2003).

L'orientation de la réponse des T auxiliaires ne dépendrait pas forcément de l'appartenance des DC à la lignée myéloïde ou lymphoïde mais dépendrait aussi des cytokines produites par les DC. Les interleukines de la famille de l'IL-12 (IL-2 ; IL-23 ; IL-27) et les interférons (Kadowaki et al., 2000; de Jong et al., 2005; Trinchieri et al., 2003) sont associés à des réponses de type Th1. D'un point de vue moléculaire, l'IL-12p70 produite en grande quantité après reconnaissance de pathogènes suivie d'une stimulation par CD40L (Krug et al., 2001b) est un élément majeur de la polarisation Th1. La polarisation des réponses Th2 impliquerait des cytokines comme l'IL-6 et des molécules comme OX40-L (Akiba et al., 2000; Ekkens et al., 2003; Ishii et al., 2003).

Récemment, un nouveau type de cellules TCD4⁺ effectrices a été identifié : les cellules Th17. Il semblerait que ces cellules Th17 interviendraient dans des phénomènes inflammatoires autoimmuns. Elles ont un rôle particulièrement important dans les modèles EAE (Steinman, 2007). Les souris KO pour l'IL23 ou déficientes pour l'IL17 sont en effet résistants à l'induction d'une EAE (Cua et al., 2003; Komiyama et al., 2006). Les cellules Th17 produisent de grandes quantités d'IL-17 et participent à la protection contre les bactéries extracellulaires (Annunziato et al., 2007).

III.3.4 La différenciation des cellules TCD8⁺

Deux populations de cellules TCD8⁺, les lymphocytes Tc1 et Tc2, avec des profils de cytokines distincts de type Th1 ou Th2 ont été décrites chez la souris (Sad and Mosmann, 1995), chez le rat (Noble and Kemeny, 1995) et l'homme (Vukmanovic-Stejic et al., 2000). La différenciation des précurseurs en lymphocytes Tc1 est induite par l'IFN- γ et l'IL-12 alors que la différenciation en lymphocytes Tc2 est induite par l'IL-4. Les lymphocytes Tc1 produisent de l'IFN- γ et l'IL-2, mais d'IL-4, alors que les lymphocytes Tc2 produisent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL10 mais pas d'IFN- γ . Les cellules CD8⁺ Tc1 et Tc2 expriment des niveaux similaires de perforine et de Fas et possèdent une activité cytotoxique équivalente. De plus, les cellules TCD8⁺ naïves montrent une forte préférence pour une différenciation en cellules Tc1.

IV. Les cellules dendritiques plasmacytoides

En 1958, Lennert a décrit ces cellules comme une population de cellules de taille moyenne ressemblant aux plasmocytes. Comme elles n'exprimaient pas leurs marqueurs de membrane, mais le marqueur de la lignée TCD4 et qu'elles étaient abondantes dans les zones T des organes lymphoïdes secondaires, elles ont été nommées cellules T plasmacytoides (Lennert, 1958; Lennert et al., 1975). Paradoxalement ces cellules n'exprimaient pas les autres marqueurs caractéristiques « forts » de lignée T (comme les sous-unités du CD3 exprimées en surface ou le TCR) (Facchetti et al., 1988a; Facchetti et al., 1991). La mise en évidence, plus tard, de l'expression de marqueurs assignés à la lignée monocyttaire comme le CD68 les ont fait renommer monocytes plasmacytoides (Facchetti et al., 1988a; Horny and Horst, 1986,

Facchetti et al., 1989a). Suite à cette caractérisation, elles ont été décrites dans les ganglions normaux et réactionnels (Facchetti et al., 1991; Facchetti et al., 1988b) ainsi que dans différents tissus inflammatoires : lymphadénite granulomateuse (Facchetti et al., 1989a)...etc.

En 1997, deux équipes (Grouard et al., 1997, Olweus et al., 1997) ont montré que ces cellules avaient des propriétés fonctionnelles qui les rattachaient à la lignée dendritique et c'est ainsi que les cellules dendritiques plasmacytoïdes ou pDC ont été caractérisées.

Les virologistes, de leur côté, avaient décrit des cellules sanguines de petite taille qui n'étaient rattachées à aucune lignée de cellules sanguines, qui exprimaient le CD4 et les molécules HLA classe II et qui possédaient une très forte capacité de sécrétion d'IFN- α en réponse à une stimulation virale (Fitzgerald-Bocarsly, 1993). Ils l'avaient nommé la cellule naturelle productrice d'IFN- α (natural IFN- α producing cell (NIPC)).

En 1999, les groupes de Liu et Colonna ont montré parallèlement que les précurseurs des pDC avaient la capacité de forte production d'IFN- α en réponse à une stimulation virale et qu'elles correspondaient à la principale cellule sécrétrice d'IFN- α de l'organisme (IPC pour IFN- α producing cell) (Cella et al., 1999; Siegal et al., 1999).

Les différents noms de ces cellules utilisés dans la littérature sont : cellules dendritiques plasmacytoïdes ou pDC, IPC, DC CD11c⁻, DC lymphoïdes. Initialement, elles ont été aussi nommées DC2 du fait de leur profil de sécrétion de cytokines (Grouard et al., 1997; Patterson, 2000) et leur capacité à orienter les lymphocytes TCD4⁺ naïfs à sécréter des cytokines de type 2.

Les pDC possèdent des caractéristiques qui leur sont propres : les cytokines nécessaires à leur développement, leur phénotype, leur réponse aux pathogènes les corrélant à une expression particulière de PRR, leur production de cytokine, leur capacité migratoire et leurs fonctions les différencient sur tous ces points des cellules dendritiques myéloïdes.

IV.1 Localisation des cellules dendritiques plasmacytoïdes dans l'organisme

Chez l'homme, les pDC sont présentes à différents stades de maturation dans les zones T des ganglions (Banchereau et al., 2000b), au niveau du sang et de la moelle osseuse (Grouard et al., 1997; Blom et al., 2000), du sang placentaire (Sorg et al., 1999) et du thymus (Res et al., 1999; Marquez et al., 1998).

Dans les ganglions lymphatiques, les pDC sont retrouvées au niveau des zones T extra folliculaires paracorticales mais pas au niveau des centres germinatifs (Grouard et al., 1997). De plus, elles sont observées aussi dans les zones proches des veinules post capillaires (HEV) suggérant bien leur extravasation à partir du sang dans les ganglions (Grouard et al., 1997).

Dans le sang, le précurseur circulant des pDC (pré-DC2 ou pré-pDC) représente 0,3 à 0,5% des cellules mononuclées (Banchereau et al., 2000b; Olweus et al., 1997).

Au niveau du thymus et de la zone médullaire surtout, les DC participent à la sélection négative des lymphocytes T autoréactifs. Les pDC sont plus importantes quantitativement dans le thymus que les DC myéloïdes matures ou immatures (correspondant aux cellules dendritiques interstitielles) (Lanzavecchia and Sallusto, 2001; Res et al., 1996; Res et al., 1999; Bendriss-Vermare et al., 2001).

Les pDC sont aussi retrouvées dans certains contextes pathologiques : ganglions réactionnels ou pathologiques (Banchereau et al., 2000b; Facchetti et al., 1991; Facchetti et al., 1988b; Facchetti et al., 1989a; Facchetti et al., 1989b), et dans d'autres sites : la peau infiltrée (Facchetti et al., 1990), les dermatites atopiques (Bangert et al., 2003), la peau des sujets atteints de lupus (Ronblom and Alm, 2001; Bave et al., 2003), les muqueuses de patients allergiques (Jahnsen et al., 2002; de Heer et al., 2004) et dans différentes tumeurs (Hartmann et al., 2003; Zou et al., 2001).

IV.2 Identification des cellules dendritiques plasmacytoïdes

IV.2.1 Morphologie des cellules dendritiques plasmacytoïdes

Chez l'homme, les pDC possèdent une morphologie particulière avec un cytoplasme relativement abondant et basophile, un noyau excentré, ce qui les fait ressembler à des plasmocytes, d'où leur dénomination initiale de cellules T

plasmacytoides ou monocytes plasmacytoides puis de DC plasmacytoides (pDC). Elles ont une taille de 8 à 10µm. Sur le plan ultra structural, elles présentent un réticulum endoplasmique abondant et un appareil de Golgi très développé, suggérant une cellule différenciée possédant une forte capacité sécrétoire (Grouard et al., 1997).

IV.2.2 Marqueurs phénotypiques des cellules dendritiques plasmacytoides

Chez l'homme, les pDC n'expriment pas les marqueurs spécifiques de lignée B, NK, T, monocytaire, myéloïde ou exprimés par les cellules de Langerhans (CD1a⁻) (Blom et al., 2000; Chaperot et al., 2001; Grouard et al., 1997; Comeau et al., 2002). Elles n'expriment pas non plus les marqueurs de progéniteurs CD34 (Grouard et al., 1997). Contrairement aux DC myéloïdes, elles n'expriment pas (chez l'homme) le CD11c, ni le récepteur au mannose et n'expriment que faiblement le récepteur au GM-CSF (CD116) (Grouard et al., 1997; Olweus et al., 1997). Par contre, elles sont caractérisées par l'expression des marqueurs suivants : CD4⁺ CD45RA⁺ HLA-DR⁺. L'absence de marqueurs phénotypiques spécifiques à cette cellule a été un frein à sa caractérisation. La mise en évidence de la forte expression du récepteur à l'IL-3 : CD123^{+fort} a permis ensuite de les identifier plus facilement en cytométrie en flux.

Les pDC expriment tout de même certains marqueurs communs avec la lignée monocytaire, comme le CD68 (microsialine) (Strobl et al., 1998) et le CD36 (récepteur à la thrombospondine) (Cella et al., 2000; Comeau et al., 2002).

Les ILT (immunoglobulin like transcripts/ LIR : leucocyte immunoglobulin like receptors) représentent une nouvelle famille de récepteurs inhibiteurs ou activateurs de la superfamille des immunoglobulines, impliqués dans les mécanismes de surveillance immune. Les récepteurs ILT sont classés en trois groupes : (1) des récepteurs inhibiteurs possédant des motifs ITIM (Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) intracytoplasmiques et traduisant un signal inhibiteur comme ILT2, ILT3, ILT4, ILT5, LIR8, (2) des récepteurs activateurs possédant des motifs ITAM intracytoplasmiques (Immunoreceptor tyrosin-based activated motif), comme IL-T1, ILT7, ILT8, LIR6 et (3) une molécule soluble ILT6 qui ne possède pas de région transmembranaire (Colonna et al., 2000). Certains de ces récepteurs ILT sont exprimés de façon différentielle par les DC. Ainsi, les pDC ont un phénotype ILT3⁺ ILT1⁻ alors que les DC myéloïdes expriment ILT1⁺ ILT3⁺ (Banchereau et al., 2000b; Cella et al., 1999; Cella et al., 1996).

En 2000, Dzionek et al ont caractérisé 2 marqueurs, BDCA-2 et BDCA-4, exprimés spécifiquement sur les pDC circulantes, améliorant et simplifiant leur identification directe en cytométrie en flux (Dzionek et al., 2000; Dzionek et al., 2001).

BDCA-2 est une lectine C de type II exprimée par les pDC et qui jouerait un rôle dans l'internalisation des antigènes. Dans le sang, toutes les cellules BDCA-2⁺ possèdent le phénotype de pDC tel qu'il a été décrit (CD4⁺ CD45RA⁺ HLA-DR⁺ CD11c⁻ Lineage⁻ CD123^{fort}). Dans la moelle osseuse de sujets normaux, on retrouve cette population et, en plus, il est intéressant de noter qu'une petite proportion de cellules expriment BDCA-2 et CD45RA plus faiblement et expriment CD34 (Dzionek et al., 2002). A noter que BDCA-2 est rapidement perdu sur les pDC matures en culture et que donc il ne peut être utilisé pour identifier les pDC matures in vivo (Dzionek et al., 2002; Dzionek et al., 2001).

BDCA-4 ou Neuropilin-1(NP-1) est un récepteur multifonctionnel neuronal qui appartient à la classe des sémaphorines 3. Il est exprimé sur les cellules endothéliales et tumorales comme récepteur pour différents membres de facteurs de croissance de la famille VEGF (Vascular endothelial growth factor) et joue un rôle dans l'angiogénèse. De plus, il a été montré qu'il était impliqué dans la synapse DC/ lymphocytes T durant la réponse primaire par interaction homophile (Tordjman et al., 2002). BDCA-4 est spécifiquement exprimé sur les pDC dans la moelle osseuse et le sang et sur les précurseurs de pDC (CD34^{faible} BDC2^{faible} CD45RA^{faible}) dans la moelle osseuse. Dans les ganglions, il peut être exprimé sur des fractions lymphocytaires T CD4⁺ (Dzionek et al., 2002). En culture, l'expression de BDCA-4 n'est pas perdue comme BDCA-2.

Deux autres marqueurs identifiés par Dzionek et al permettent de différencier les pDC des DC myéloïdes circulantes : contrairement aux DC myéloïdes, les pDC n'expriment pas BDCA1 (CD1c) et BDCA3 (Dzionek et al., 2000). Les pDC expriment aussi des molécules d'adhérence comme : CD11a⁺, CD18⁺, CD44⁺, CD49e⁺, CD31⁺ (PECAM-1) et CD54⁺ (Grouard et al., 1997). Elles n'expriment pas ou peu à l'état basal les molécules de costimulation CD40, CD80 et CD86 (Grouard et al., 1997).

Les précurseurs, équivalents des pDC chez l'homme, ont été identifiés chez la souris, dans les organes lymphoïdes (Asselin-Paturel et al., 2001). Comme les pDC humaines, les pDC murines n'expriment pas de marqueurs T, B ni le CD11b. Les pDC murines expriment, contrairement aux pDC humaines, le CD11c mais plus faiblement que les DC conventionnels. Ce marqueur myéloïde est faiblement exprimé par les pDC

extraites des organes lymphoïdes et fortement exprimé par les pDC générées in vitro (Gilliet et al., 2002). Les pDC murines présentent un phénotype CD11C, CD4^{+/+}, IL-3R⁻, B220⁺.

Chez le rat, notre équipe a identifié une nouvelle population de leucocytes CMH de classe II⁺ CD4⁺ CD3⁻ CD11b⁻ parmi les splénocytes qui produit de grandes quantités d'IFN de type I après une stimulation virale et qui est homologue aux pDC précédemment décrites chez l'homme et chez la souris. Ces cellules ont le phénotype suivant : CD5⁺, CD90⁺, CD45R⁺, CD45RC⁺, CD11c⁻, CD161a⁺, CD200⁺, CD172a⁺, CD32⁺, CD86⁺. Les pDC de rat n'expriment pas le marqueur spécifique des DC OX62 (CD103) et sont plus abondantes dans la rate que les populations de DC CD4⁺ et CD4⁻ classiques que nous avons déjà décrites et qui sont de très faibles productrices d'IFN de type I (Hubert et al., 2004).

IV.2.3 Origine des cellules dendritiques plasmacytoïdes

Différentes études ont montré que les pDC peuvent être dérivées d'un progéniteur pluripotent lymphoïde (moelle osseuse et thymus) capables de générer toutes les cellules lymphoïdes (lymphocytes B, T et NK) et les pDC mais pas les autres cellules hématopoïétiques (Banchereau et al., 2000a; Ardavin et al., 1993; Res et al., 1996; Galy et al., 1995; Bendriss-Vermare et al., 2001; Liu et al., 2001; Marquez et al., 1998; Bjorck and Kincade, 1998). Ce progéniteur médullaire lymphoïde commun (aux lignées lymphoïde et pDC) exprime CD45RA et le CD10 (Galy et al., 2000). Concernant la différenciation des pDC, le progéniteur passerait par un stade précoce, puis tardif et passe finalement au stade pro-DC2 (ou pro-pDC), correspondant au précurseur immédiat des Pré-pDC (Pré-DC2). A ce stade, les cellules possèdent déjà une morphologie plasmacytoïde et sont identifiées dans le sang placentaire, le foie et la moelle osseuse fœtale et en très faible quantité dans le sang (Blom et al., 2000).

	Progéniteur Précoce	Progéniteur Tardif	Pro-DC2	Pré-DC2
CD34	++	++	+	+
CD45RA	-	+	++	++
CD4	+	+	++	++
CD123	+	+	++	++
Capacité de production d'IFN- α	-	-/+	+++	+++
Capacité Proliférative	+++	++	+	--

Tableau 03 : Schéma représentant le développement des Pré-pDC à partir d'un progéniteur précoce CD34⁺ (d'après Blom et al., 2000).

IV.2.4 Génération des cellules dendritiques plasmacytoïdes in vitro

Le FLT-3 ligand est un facteur indispensable dans la différenciation des pDC à partir des progéniteurs CD34⁺ chez la souris et l'homme. En effet, la culture de progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ d'origine médullaire, sanguine ou isolés de foie fœtal en présence de FLT3-ligand permet d'obtenir des pDC en 2 à 3 semaines (Blom et al., 2000). Le FLT-3 ligand est aussi impliqué dans le développement et l'expansion de la voie dendritique en général (DC myéloïdes et pDC) lors de l'hématopoïèse (Gilliet et al., 2002).

L'IL-3 est une cytokine indispensable à la survie des pDC et à leur maturation en culture chez l'homme (Grouard et al., 1997). La présence de virus permet aussi leur maintien en culture. Sans ces facteurs, elles meurent rapidement par apoptose. D'ailleurs, les pDC expriment fortement le récepteur à l'IL-3 (CD 123) chez l'homme.

La maturation des pDC in vitro nécessite la présence de CD40L, de ligands TLR 7 ou 9, de virus. Les pDC matures acquièrent une autre morphologie (développement de longs dendrites) avec une augmentation d'expression des molécules de costimulation CD80, CD40, CD86 et HLA-DR (ou class II), ainsi que l'acquisition de CD83 et DC-

LAMP (DC-lysosome-associated membrane protein) et l'induction de la molécule d'adhérence CD54 (Grouard et al., 1997).

IV.2.5 Caractéristiques fonctionnelles des cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les pDC possèdent une grande plasticité dans leurs fonctions. Elles interviennent dans les mécanismes de tolérance aux autoantigènes au niveau du thymus et en périphérie, contribuent aux défenses innées antivirales et antibactériennes et comme de véritables APC, elles acquièrent les capacités d'induire une réponse immune adaptative. Il est intéressant de noter qu'elles seraient impliquées dans la pathogénèse de certaines maladies comme le lupus et qu'elles sont sélectivement recrutées par certains types de tumeurs.

Les fonctions cellulaires des pDC sont différentes en fonction du stade de maturation. Les pDC dérivent d'un progéniteur hématopoïétique (lymphoïde ?) qui va donner naissance aux pré-pDC circulantes (la cellule sécrétrice d'IFN- α) qui vont ensuite évoluer en pDC matures sous l'influence d'IL-3, de CD40L, de virus ou d'ADN bactériens comportant des motifs CpG non méthylés (Jarrossay et al., 2001; Krug et al., 2001b). Il est vraisemblable que la dichotomie pDCimmature/pDC mature ne soit pas aussi clairement tranchée pour les pDC que pour les mDC et que in vivo, le stade pDC immature décrit initialement dans la littérature correspond en fait au stade pré-pDC (le terme immature correspond dans ce cas au stade fonctionnel de ces cellules qui possèdent un phénotype immature).

Comme nous l'avons décrit précédemment, le précurseur circulant des pDC (pré-pDC) produit de grandes quantités d'IFN- α en réponse à une stimulation virale et est identifié chez l'homme comme la cellule principale sécrétrice d'IFN- α en réponse à un virus (réponse innée) (Banchereau et al., 2000a). Sur la base des premières études de la littérature, au stade immature (pré-pDC), à la différence des DC myéloïdes, les pDC possèderaient de faibles capacités d'endocytose, de phagocytose ou de macropinocytose. Toutefois, Fonteneau et al ont montré qu'elles étaient aussi efficaces que les mDC in vitro pour capter, présenter des antigènes viraux et induire la prolifération et la différenciation de lymphocytes T CD4⁺ Th1 et ainsi induire une réponse antivirale adaptative (Fonteneau et al., 2003). In vitro, comme les DC

myéloïdes, en l'absence de stimulation préalable, les DC plasmacytoïdes ont de faibles capacités allo-stimulatrices, alors qu'après maturation induite par l'IL-3/CD40L ou par un agent viral/bactérien, elles induisent la prolifération de lymphocytes T naifs.

Suite à une stimulation virale, bactérienne ou à une interaction avec CD40L, les pDC circulantes acquièrent les caractéristiques de pDC matures. En plus de l'apparition des dendrites et de l'expression des molécules classe II (HLA) et des molécules de costimulation, la maturation des pDC se caractérise aussi par l'induction de CCR7 et *in vivo*, de la migration des pDC au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Dans les ganglions, elles se localisent dans les zones T paracorticales et jouent un rôle de véritables APC en stimulant les lymphocytes T. Ceux-ci expriment alors CD40L, ce qui complète la maturation des pDC et augmente leur capacité stimulatrice des lymphocytes T.

En fonction de leur mode d'activation, les pDC peuvent induire une polarisation des lymphocytes T vers la production de cytokines de type 1 (après stimulation virale) (Cella et al., 2000) ou de type 2 (après maturation par CD40 L) (Rissoan et al., 1999). Cette capacité d'induire un profil type 1 ou 2 serait fonction de l'environnement dans lequel se trouvent les pDC. Chez le rat, les pDC matures induisent essentiellement une réponse de type Th1 (Hubert et al., 2004). Néanmoins, en fonction du stimulus initial, il a été montré que les pDC sont capables de générer des réponses Th1, Th2 et des cellules T régulatrices (Shortman and Liu, 2002). Les fonctions stimulatrices des pDC ne se limitent pas aux cellules T puisque, elles interagissent avec les cellules NK, et à travers leur production de cytokines en particulier l'IFN- α et l'IL-6, ces cellules permettent l'activation des cellules B (Jego et al., 2003) et la différenciation rapide de monocytes en DC (Santini et al., 2000). Les pDC jouent un rôle dans la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes sécréteurs d'immunoglobulines (Jego et al., 2003). Banchereau et al ont montré d'ailleurs un mécanisme en deux temps. L'IFN- α/β sécrété par les pré-pDC activées par un virus induit d'abord la différenciation des lymphocytes B vers des plasmoblastes non sécréteurs d'immunoglobuline, puis l'IL-6 sécrétée par les pDC les différencie en plasmocytes sécréteurs d'Ig.

Les pDC à différents stades de maturation activent les effecteurs de l'immunité innée comme les lymphocytes NK et NKT. Ainsi l'IFN- α sécrété par les pré-DC active les NK et donc augmente leur activité antivirale et antitumorale, alors que les pDC matures polarisent les lymphocytes NKT vers la production d'IL-4.

IV.2.6 Orientation de la réponse immune

Il a d'abord été montré dans la littérature que les pDC produisent peu d'IL-12 après maturation (Banchereau et al., 2000a; Banchereau et al., 2000b), et induisent plutôt la production de cytokine de type 2, comme l'IL-4 et l'IL-5 par les lymphocytes T. Depuis cette description, la compréhension de l'orientation de la réponse immune par les pDC a évolué. En fait, l'orientation de la réponse immune par les pDC est complexe et la polarisation des lymphocytes T induite par les pDC dépend de leur stade de maturation et différenciation et de la nature du signal qui les stimule. En effet, les pré-pDC stimulées par un virus, secrètent de grandes quantités d'IFN- α , puis deviennent matures et induisent la production d'IFN- γ par les lymphocytes T. Lors d'une stimulation, in vitro, par CD40L, les pDC orientent les T vers la sécrétion de cytokines de type 2 (IL-4, IL-5). Cette description concerne que les réponses de type Th1 et Th2 et ne concerne pas les réponses de type Th3 (avec la production de TGF- β) ou de type Tr1 (avec la production d'IL-10) qui peuvent être induites par les pDC (Cella et al., 2000; Dzionek et al., 2002). Par contre, Kadowaki et al ont démontré, que les pré-pDC stimulées par un virus, induisent les T naïfs à produire de l'IFN- γ et de l'IL-10, réponse différente de la voie classique Th1 ou Th2. Ce type de réponse a été mis en évidence dans les réponses aux pathogènes intracellulaires (virus, certaines bactéries, parasites) et il a été suggéré que l'IL-10 protège l'hôte d'une réponse immune cellulaire excessive (Kadowaki et al., 2000).

Le rôle de la production d'IL-10 par une sous-population particulière de DC murines (Wakkach et al., 2003) a été bien montré par Groux comme capital pour l'induction de lymphocytes Tr1. Ceci nous mène à l'idée que les pDC sont capables de générer des populations de lymphocytes régulant la réponse immunitaire. On verra ça plus loin dans le chapitre V.

Différentes données générées in vitro (**Figure 7**) (Cella et al., 2000; Dzionek et al., 2002; Krug et al., 2001b; Rissoan et al., 1999; Kadowaki et al., 2000) montrent la plasticité fonctionnelle des pDC.

IV.2.7 Cellules dendritiques plasmacytoides et IFN type I

Chez l'homme, la famille des **IFN type I** comporte 15 isotypes (13 isotypes IFN- α , 1 IFN- β et 1 IFN- ω). L'**IFN- α** (produit par les leucocytes) et l'**IFN- β** (produit par les fibroblastes) sont les 2 types d'IFN type I majeurs possédant une activité antivirale. Ils induisent l'augmentation de l'expression des molécules HLA de classe I sur tous les types cellulaires et activent les macrophages et cellules NK. Ils ont aussi un rôle dans l'activation et la survie des lymphocytes TCD4⁺ et CD8⁺ (Siegal et al., 1999), dans la différenciation B et la sécrétion d'immunoglobulines.

Siegal et al et Cella et al ont montré que les leucocytes spécialisés dans la sécrétion d'IFN α/β (IPC) correspondent aux pré-pDC circulantes (Siegal et al., 1999). La production rapide d'IFN- α/β par les IPC, en l'absence d'autres cellules, suggère bien que ces cellules sont des effecteurs de l'immunité innée et réagissent grâce à la stimulation directe de récepteurs aux virus. La capacité des virus irradiés par les UV à induire aussi la production d'IFN- α montre que l'infection virale n'est pas nécessaire pour entraîner la production d'IFN- α mais qu'elle est liée à l'interaction avec le virus ou certains de ces composants (Siegal et al., 1999 ; Yonezawa et al., 2003).

La production d'IFN- α/β et de TNF- α par les pré-pDC activées par un virus agissent respectivement comme facteur de survie autocrine et facteur de différenciation des pré-pDC en pDC matures qui seront capables d'induire une réponse immune adaptative (Kadowaki et al., 2000).

Une stimulation virale des pDC peut aussi, en plus de la production IFN type I, entraîner la production d'autres cytokines, mais les mécanismes d'induction de la sécrétion de ces facteurs restent inconnues. La production d'IFN de type I est, dans les pDC, dépendante de plusieurs mécanismes moléculaires et du TLR engagé. Ainsi, en réponse aux TLR3 et TLR4 dans les DC conventionnelles, la production d'IFN est dépendante du facteur IRF-3 (Interferon IFN regulatory factor) tandis qu'en réponse aux TLR7 et TLR9 dans les pDC c'est le facteur IRF-7 (IFN regulatory factor 7) qui est activé (Honda et al., 2005; Baccala et al., 2007).

IV.2.8 Cellules dendritiques plasmacytoides et Toll like receptor

Les pDC expriment un répertoire limité de Toll-like receptors (TLR) avec une expression spécifique et forte des TLR 7 et TLR 9 ce qui leur confère une réponse spécifique à certains déterminants pathogéniques (Kadowaki et al., 2001).

IV.2.8.1 TLR 9

Comme on l'a déjà mentionné dans le chapitre II.2.1, le TLR 9 reconnaît les motifs CpG de l'ADN bactérien et engendre également une stimulation de la réponse immune (Medzhitov, 2001). Des oligodésoxynucléotides synthétiques qui contiennent des motifs déoxycytidyl-déoxyguanosine non méthylés sont utilisés (CpG-ODN) pour miner l'effet de l'ADN bactérien (Bauer et al., 2001). Les pDC ont été identifiées comme la cible principale des CpG-ODN (Hornung et al., 2002) et, basés sur leur activité distincte sur les pDC, 3 types de CpG-ODN ont été identifiées : (1) les CpG type A (prototype ODN 2216) qui induit une forte sécrétion d'IFN- α et peu d'IL-12 par les pDC (2) les CpG type B (prototype ODN 2006) qui est un faible inducteur d'IFN- α mais qui favorise la survie, la maturation des pDC et la sécrétion d'IL-8 (Kerkmann et al., 2003), il induit aussi une importante production de cytokines inflammatoires comme l'IL-12 et le TNF- α (Krug et al., 2001b; Verthelyi et al., 2001). (3) un troisième groupe de CpG ODN de type C a été identifié, il combine les effets des deux premiers groupes (Vollmer et al., 2004). La spécificité de ces 3 ligands a été confirmée chez des souris déficientes en TLR 9 : toutes les réponses des pDC aux CpG A et B sont abolies, alors qu'elles ne le sont pas pour les autres ligands de TLR (Hochrein et al., 2002).

Certains virus comme le virus Herpes simplex contiennent aussi des motifs CpG capables de stimuler les pDC à produire de l'IFN- α via le TLR 9 (Lund et al., 2003). Les lymphocytes B expriment aussi le TLR 9 et réagissent aux CpG-ODN type B (Hornung et al., 2002; Baccala et al., 2007). Il semblerait que l'activation des monocytes, des lymphocytes NK et des lymphocytes $\text{T}\gamma\delta$ et des lymphocytes TCD8^+ par les CpG-ODN se ferait par l'intermédiaire des cytokines libérées par les pDC, et non par une interaction directe avec le récepteur TLR 9 qui n'est pas ou faiblement exprimé sur ces cellules (Kerkmann et al., 2003) (**Figure 8**).

La reconnaissance d'ADN bactériens par le TLR 9 des pDC induit leur maturation (augmentation d'expression de CD40, CD80, CD86, CD83, et de CCR7),

ainsi que la production d'IFN- α , de TNF- α , d'IL-6 et de chimiokines inflammatoires. La stimulation combinée des pDC par CD40L et TLR 9 sont synergiques pour la production d'IFN- α et d'IL-12p70 par les pDC et nécessaire pour induire la production de lymphocytes T sécrétant des cytokines de type 1 (Krug et al., 2001b). Ainsi les motifs CpG sont de puissants adjuvants de la polarisation de type 1 (IFN- α , IFN- γ et IL-12) utilisés souvent comme adjuvants en vaccination anti-infectieuse ou anti-tumorale (De Wit et al., 2004).

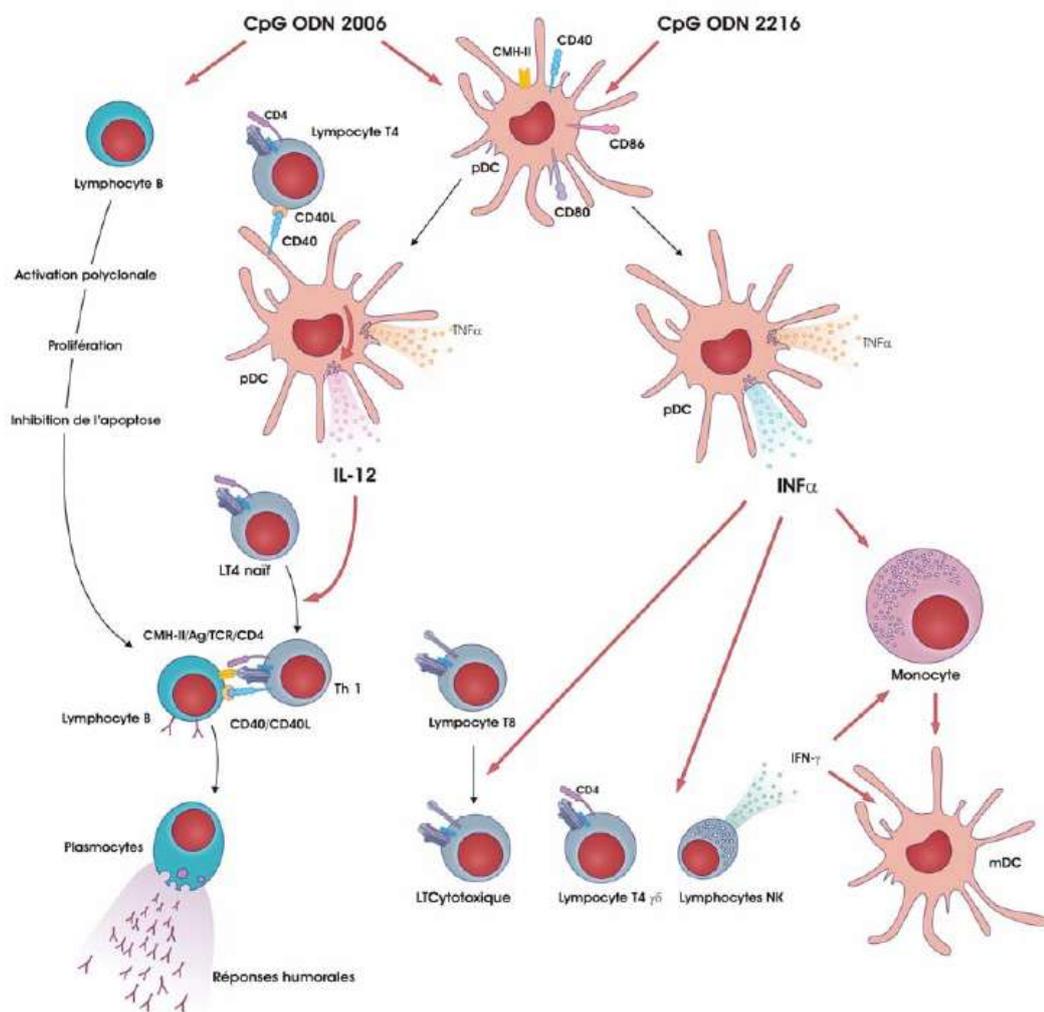


Figure 8 : Rôle des CpG dans la réponse immune (D'après (Rothenfusser et al., 2004)

Les pDC et les lymphocytes B sont directement activés par les CpG-ODN. La stimulation des autres cellules comme les monocytes, mDC, lymphocytes T et NK est médiée par les CK sécrétées par les pDC. **CPG-A ODN 2216** induit une forte sécrétion d'IFN- α par les pDC. L'IFN- α stimule les lymphocytes NK et les T $\gamma\delta$ à produire de l'IFN- γ . L'IFN- α sécrété par les pDC et l'IFN- γ agissent ensemble pour stimuler

les monocytes et les mDC. De plus, l'IFN- α augmente la cytotoxicité des CTL. **CpG-B ODN 2006** agit en synergie avec CD40L pour stimuler la production d'IL-12 par les pDC permettant ainsi l'activation des lymphocytes TCD4⁺ naïfs vers la production de cytokines de type1. Ces lymphocytes TCD4⁺ Th1 en combinaison avec l'activation directe des lymphocytes B par les CpG B entraînent une forte stimulation de l'immunité humorale.

IV.2.8.2 TLR 7

Il a été montré que les pDC sont capables de reconnaître les virus ARN simple brin (ssARN) par le TLR 7 exprimé par les pDC et les lymphocytes B (Lund et al., 2004) et que cela entraîne leur activation. Les ssARN localisés dans le compartiment endosomal représentent dans ce cas la signature moléculaire de l'infection virale qui activera la pDC par l'intermédiaire de TLR 7 (Lund et al., 2004; Baccala et al., 2007).

V. La tolérance

A l'état physiologique, la **tolérance au soi** est une caractéristique fondamentale du système immunitaire essentielle pour le maintien de l'homéostasie et la prévention des maladies auto-immunes. Pour induire la tolérance, le système immunitaire utilise différents mécanismes, tant au niveau du **thymus (tolérance centrale)** qu'au niveau **périphérique (tolérance périphérique)**.

V.1 La tolérance centrale

Physiologiquement, l'organisme met en place des mécanismes de tolérance au soi (auto -antigène) évitant ainsi le développement d'une réponse immune contre ses propres constituants. La tolérance centrale, au niveau du thymus, par **sélection négative** entraîne par apoptose la mort de 90 à 99% des thymocytes autoréactifs produits. L'importance physiologique de la tolérance néo-natale centrale a été mise en évidence par Sakaguchi, montrant qu'une thymectomie, 3 jours après la naissance, induisait un large spectre de maladies autoimmunes (Sakaguchi et al., 2001). Les clones autoréactifs possédant un récepteur T (TCR) pour l'antigène, de forte affinité pour les auto-antigènes présentés par les molécules du CMH des cellules dendritiques thymiques sont éliminés. Le phénomène de tolérance réside donc surtout dans des mécanismes délétionnels des lymphocytes néo-formés autoréactifs, lors du processus de sélection négative, mais il implique également la formation de lymphocytes T régulateurs,

puisque l'injection intrathymique d'antigène du soi et du non soi induit la formation de thymocytes régulateurs induisant la tolérance (Durkin and Waksman, 2001). Cependant, les mécanismes centraux (Thymiques) ne peuvent expliquer totalement la tolérance au soi et d'autres mécanismes périphériques sont mis en place par l'organisme pour parer à une tolérance centrale déficiente.

V.2 La tolérance périphérique

Les mécanismes de tolérance périphériques permettent d'éliminer hors du thymus les éventuels clones auto-réactifs ayant échappé à la délétion intra-thymique (sélection négative) ou les clones dirigés contre des auto-antigènes absents dans le thymus. Cinq mécanismes majeurs non exclusifs entre eux ont été proposés pour expliquer l'induction ou le maintien de la tolérance des lymphocytes T : l'ignorance immunologique, la délétion clonale, l'anergie clonale, la déviation immune et la suppression active (Kamradt and Mitchison, 2001; van Parijs et al., 1998; Brennan et al., 2003; Macian et al., 2004 ; Ochsenbein, 2005; Taams and Akbar, 2005; Wells et al., 2001; Wing et al., 2005).

V.2.1 L'anergie

Il s'agit d'un état de non réponse stable et spécifique des lymphocytes T à un antigène, les cellules ne prolifèrent pas même si elles sont stimulées dans des conditions optimum. L'induction de l'anergie est souvent associée à une interaction des lymphocytes avec des DC immatures (Macian et al., 2004). L'anergie des lymphocytes T est induite par les CPA, généralement après une stimulation antigénique incomplète, par exemple en l'absence du signal de costimulation. L'anergie clonale peut être définie comme une « paralysie fonctionnelle » des lymphocytes T, caractérisée par une incapacité de production de cytokine (IL-2) et une incapacité à répondre à une nouvelle stimulation antigénique (Falb et al., 1996). Les lymphocytes T anergiques sont cependant toujours capables de répondre aux cytokines produites par d'autres cellules. Il s'agit donc d'un état réversible et la tolérance, liée à un état d'anergie, peut être seulement temporaire.

V.2.2 Délétion clonale

En périphérie, la survie des cellules T naives dépend de l'activité de molécules anti-apoptotiques, telles que Bcl-2 et Bcl-xL. Son expression est induite par des voies de signalisation situées en aval du récepteur à l'IL-7. Lors d'une interaction entre TCR et son ligand, l'expression de la chaîne α de ce récepteur est fortement déprimée, ce qui conduit à une perte d'expression des molécules anti-apoptotiques (Schluns et al., 2000). L'hypothèse proposée par Redmond, soutient que dans le cas d'une interaction de faible affinité, les signaux intégrés par la cellule sont de trop faible intensité pour activer le programme génétique aboutissant à l'anergie. Par contre, le flux calcique libéré est suffisant pour induire l'expression de protéines pro-apoptotiques (telles que Bim) qui mèneront à la déletion clonale des cellules T autoréactives. Le blocage des voies de costimulation, stratégie souvent utilisée pour induire une tolérance (Sayegh and Turka, 1998), entraîne une mort passive puisque l'expression de Bcl-xL et d'IL-2 diminue. La mort « active » intervient lorsqu'il y a stimulation répétée du TCR du LT et fait intervenir les voies FAS/FASL et du TNF récepteur (van Parijs et al., 1998). Ce phénomène est dépendant de la production d'IL-2 mais indépendant de l'expression de Bcl-2 et Bcl-xL.

Ainsi, une activation incomplète des lymphocytes T par manque de signaux de costimulation peut entraîner une délétion de ces lymphocytes (Ferber et al., 1994). Plusieurs études ont également établi l'importance de la dose de l'antigène dans l'induction d'une délétion ou d'une anergie (Faria and Weiner, 2005 ; Redmond et al., 2005), mais les résultats restent encore contradictoires.

V.2.3 Ignorance immune

Le terme d'ignorance immunologique définit les cellules T potentiellement réactives, qui ne répondent pas à une stimulation antigénique. Ces cellules ne sont pas inactivées, ce qui les différencie des cellules anergiques, mais elles ignorent l'antigène (Miller et al., 1990). L'ignorance peut résulter de la séquestration de l'antigène dans des sites dits « privilégiés », non accessibles aux cellules T réactives, ou d'une absence de présentation par les cellules présentatrices d'antigène, qui les rend invisibles aux cellules T (Kurts et al., 1999).

Enfin, l'ignorance immunologique peut se mettre en place lorsque le niveau d'antigène est en dessous du seuil requis pour induire l'activation ou la délétion des cellules T (Ochsenbein, 2005).

V.2.4 La déviation immune

La déviation immune correspond à l'orientation de la réponse immune vers un profil de sécrétion de cytokines de type 2 (IL-4, IL-5), mais aussi vers le profil dit Th3 (TGF- β) ou Tr1 (IL-10). Ces 2 derniers profils de sécrétion cytokinique peuvent intervenir dans les mécanismes de suppression qui seront abordés plus loin (voir chapitre V.3.2). La déviation immune est liée au développement préférentiel de lymphocytes TCD4⁺ Th2 sans développement de lymphocytes Th1. En effet, différents modèles de tolérance induite suggèrent une déviation de la réponse immunitaire Th1 vers une réponse de type Th2 qui se traduit par une diminution des cytokines de type Th1 et au maintien et/ou augmentation des cytokines de types Th2 (Crane and Forrester, 2005). Différents facteurs interviennent dans la détermination de la réponse immune vers un profil type Th1 ou type Th2 comme la dose et le type d'antigène, le type de CMH, des facteurs génétiques, le contexte cytokinique et le type de CPA présentant l'antigène au lymphocyte T. Il est classiquement admis que la quantité d'IL-12 sécrétée par la DC joue un rôle fondamental dans l'orientation du lymphocyte vers la réponse de type Th1 (si une forte dose d'IL-12 est sécrétée par l'APC) alors que la production d'IL-4 ou d'une faible quantité d'IL-12 oriente vers un profil de type Th2 (Rissoan et al., 1999). La capacité des DC à produire des quantités suffisantes d'IL-12, directement en réponse aux pathogènes ou, secondairement, lors de son interaction avec le lymphocyte T à qui elle présente l'antigène, contribue à l'initiation et au développement de la réponse type Th1 (Cella et al., 1996). Toutefois, ces données ont été controversées par MacDonald et al (MacDonald and Pearce, 2002) qui montrent que la production d'IL-4 par les DC n'est pas nécessaire pour l'induction d'une réponse type Th2 et que de façon surprenante, la production d'IL-12 par la DC n'est pas absolument nécessaire à la réponse type Th1, mais accroît simplement le développement de cellules type Th1.

V.2.5 La suppression active

La délétion clonale et l'anergie que nous venons de décrire sont impliquées dans les mécanismes de la tolérance dits « passifs ». Une autre forme de tolérance dite « active » a été attribuée à une population de lymphocytes T suppresseurs.

Le concept de lymphocytes T suppresseurs ou régulateurs est apparu dans les années 1970 et était envisagé comme un contingent de lymphocytes T responsables du

contrôle et de l'achèvement de la réponse immune. Puis, l'intérêt des immunologistes s'est détourné de ces cellules, faute de marqueurs spécifiques pour les identifier. Ce n'est que dans les années 1990 que les travaux sur les mécanismes de tolérance centrale et périphérique et leur implication en tolérance allogénique ont généré un regain d'intérêt pour ces cellules.

V.3 Les cellules régulatrices

Au cours de ces dernières années, les cellules régulatrices ont fait l'objet d'un nombre exponentiel de publications reflétant l'enthousiasme suscité. La raison de cet engouement est double ; d'une part il témoigne d'une avancée très importante dans la compréhension du contrôle de la réponse immunitaire adaptative, d'autre part l'espoir d'une manipulation sélective de cette sous-population lymphocytaire ouvre des perspectives fascinantes en thérapeutique humaine. Leur rôle physiologique et leur implication en pathologie sont multiples. Elles ont d'abord été impliquées dans le contrôle des lymphocytes réactifs aux antigènes du soi (Sakaguchi, 2005; Sakaguchi et al., 1995). Leur potentiel a aussi été montré dans les maladies auto-immunes (Chatila, 2005) (Baecher-Allan and Hafler, 2006), en transplantation (Waldmann et al., 2006) ou encore dans la maladie du greffon contre l'hôte (Chatenoud et al., 2001). Plusieurs types de cellules régulatrices ont été décrites (Beissert et al., 2006) et sont résumées dans le tableau 2. Les cellules TCD4⁺ CD25⁺ sont les cellules régulatrices les plus étudiées. On distingue les lymphocytes T CD4⁺ CD25⁺ naturelles (Dieckmann et al., 2001; Toda and Piccirillo, 2006) et induites : Tr1 (Groux et al., 1997; Roncarolo et al., 2006) et Th3 (Weiner, 2001a ; Weiner, 2001b), Th17 induite par TGF- β (Mucida et al., 2007).

V.3.1 Les cellules T régulatrices naturelles

V.3.1.1 Les cellules CD4⁺ CD25⁺

V.3.1.1.1 Origine et caractéristiques phénotypiques

Les cellules T régulatrices naturelles CD4⁺ CD25⁺, ou innées sont présentes de façon naturelle chez les individus sains, et exercent une activité non spécifique d'antigène mais leur stimulation est spécifique d'antigène. La capacité suppressive des cellules TCD4⁺ CD25⁺ a été mise en évidence par Sakaguchi et ses collaborateurs, qui ont montré que le transfert de cellules TCD4⁺ CD25⁻ à des souris dépourvues de cellules T (souris nude) induisait le développement de nombreuses maladies auto-immunes, alors que le co-transfert avec les TCD4⁺ CD25⁺ en empêcherait le développement (Sakaguchi, 2005; Sakaguchi et al., 1995). Depuis ces travaux, ces cellules ont suscité un grand intérêt et font l'objet d'études très poussées pour comprendre leur genèse, fonctions et mécanismes d'action (Toda and Piccirillo, 2006).

On a découvert des cellules homologues chez l'homme (Dieckmann et al., 2001; Jonuleit et al., 2001) comme chez le rat (Fowell and Mason, 1993 ;Ghiringhelli et al., 2004; Stephens and Mason, 2000).

Ces cellules suppressives professionnelles dérivées du thymus inhibent l'activation, la prolifération et la réponse effectrices des clones T auto-réactifs en périphérie (Taylor et al., 2002). Les Lymphocytes TCD4⁺ CD25⁺ (Treg) sont générés in vivo dans le thymus comme les T conventionnels (Seddon and Mason, 1999) et circulent à travers les organes lymphoïdes secondaires. Ils sont sélectionnés positivement par les cellules de l'épithélium cortical (CMH d'affinité intermédiaire) (**Figure 9**). En effet, les Treg jouent un rôle majeur dans la tolérance périphérique des cellules T en contrôlant l'effet potentiellement délétère des cellules T auto-réactives ayant échappées à la délétion thymique (Sakaguchi, 2004).

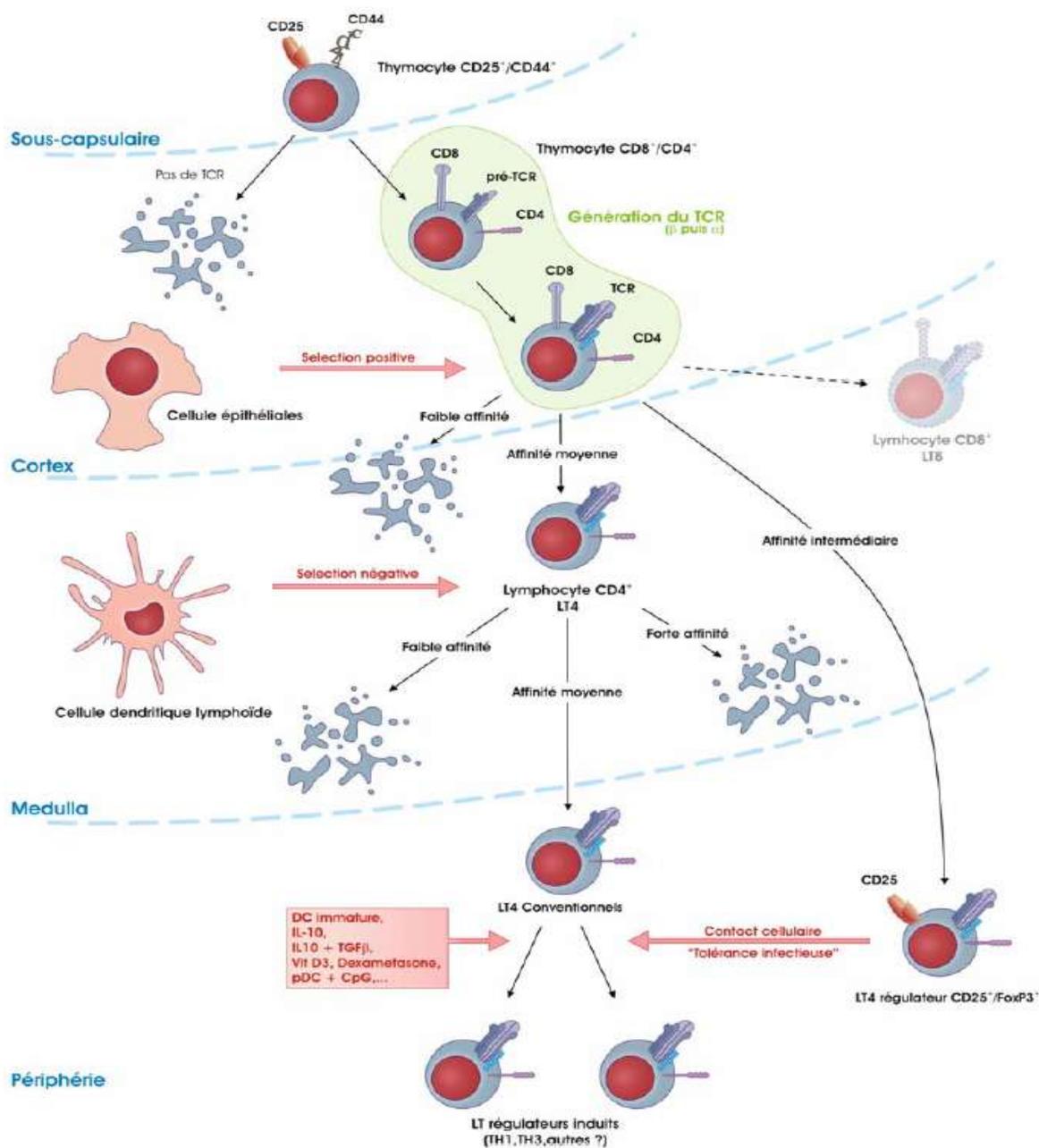


Figure 9 : Modèle de développement des lymphocytes TCD4⁺ CD25⁺ naturels lors de la sélection thymique à partir des lymphocytes T CD4⁺ conventionnels

Chez l'homme, les Treg apparaissent dès la 13^{ème} semaine de grossesse (Darrasse-Jeze et al., 2005). On les trouve dans le thymus, dans le sang de cordon, mais également en

périphérie (sang, organes lymphoïdes secondaires) ou elles peuvent être induites (Godfrey et al., 2005).

Le **CD25**, chaîne α du récepteur à l'IL-2, représente en général un marqueur d'activation des lymphocytes T. Toutefois, il est présent de façon constitutive et plus forte sur les T reg. Les cellules TCD4⁺ CD25^{fort} (Treg) représentent 5 à 10% des lymphocytes CD4⁺ périphériques (Jonuleit and Schmitt, 2003), et dans le thymus elles représentent aussi 5 à 10% des thymocytes CD4⁺ CD8⁻ (Itoh et al., 1999; Jordan et al., 2001).

Plusieurs études ont montré l'implication des molécules de costimulation **B7/ CD28** dans la génération et l'activité des cellules T régulatrices (Tang et al., 2003; Lyddane et al., 2006). Le signal fournit par le **CD28** serait critique pour la génération dans le thymus mais également pour leur genèse et leur survie en périphérie. En effet, des souris déficientes pour les molécules **CD80** et **CD86** ou **CD28** ne possèdent plus cette population de cellules régulatrices responsables de la protection du diabète chez la souris NOD (Salomon et al., 2000). De manière similaire, l'administration d'anticorps anti-B7 ou de **CTLA4-Ig** diminue le nombre de ces cellules régulatrices dans le thymus et en périphérie (Salomon et al., 2000). Salomon et al. ont établi que la liaison B7/CD28 était essentielle au développement et à l'homéostasie des cellules régulatrices naturelles TCD4⁺ CD25⁺ (Salomon et al., 2000). Des souris déficientes en CD40 possèdent un nombre réduit de cellules CD4⁺ CD25⁺, ce qui montre que l'interaction **CD40/ CD40L** semble nécessaire à la génération et au développement des cellules régulatrices (Kumanogoh et al., 2001). Le CD28 participe également à l'homéostasie des lymphocytes T régulateurs et notamment par la régulation de l'expression du CD25 à la surface de ces cellules (Tang et al., 2003).

L'**IL-2** semble être une cytokine importante dans l'homéostasie et la fonction des lymphocytes T régulateur (Setoguchi et al., 2005). En effet, les souris déficientes en IL-2 ou en chaîne α ou β du récepteur de l'IL-2 développent des pathologies auto-immunes graves similaires à celles produites par la déplétion des cellules TCD4⁺ CD25⁺ (Maloy and Powrie, 2001; Setoguchi et al., 2005). L'IL-2 n'est pas produite par les cellules TCD4⁺ CD25⁺, mais elle est essentielle à leur prolifération physiologique et leur activation et leur maintien en périphérie. L'IL-2 est aussi indispensable à la survie des TCD4⁺ CD25⁺ (Toda and Piccirillo, 2006) (**Figure 10**). En effet, ces souris déficientes en IL-2 ont très peu de CD4⁺ CD25⁺ mais ces cellules CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ possèdent une activité suppressive normale, suggérant que l'IL-2 pourrait intervenir dans la survie

ou l'expansion des Treg et non dans leur fonction. La source principale de cette cytokine IL-2 est probablement les autres cellules T, telles que les TCD4⁺ activés (CD25^{faible}) (Setoguchi et al., 2005). Ainsi, l'IL-2 semble impliquée dans une boucle de régulation négative entre les cellules T effectrices et les cellules Treg CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺. C'est-à-dire que l'IL-2 sécrétée par les T effectrices maintient et active les cellules Treg, qui une fois activées elles inhibent la production d'IL-2 par les cellules T effectrices (**Figure 10 : D'après Toda and Piccirillo, 2006**).

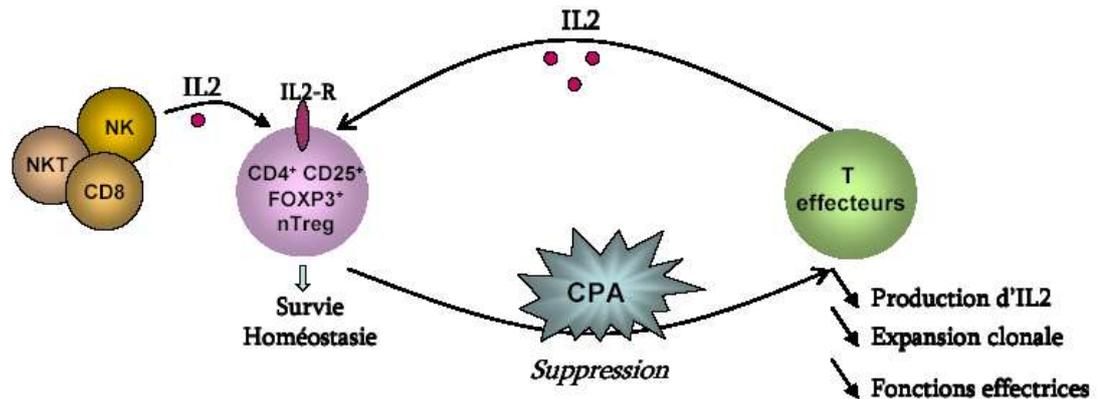


Figure 10 : Régulation de l'homéostasie périphérique des Treg CD4⁺ CD25⁺ par l'IL-2

Les cellules TCD4⁺ CD25⁺ naturelles n'ont pas un phénotype unique et clairement défini. Cependant, il est bien établi qu'elles expriment de manière constitutive la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (Sakaguchi et al., 1995). L'expression du CD25 n'est pas restreinte à la population régulatrice/suppressive puisque après activation, les cellules naïves acquièrent le CD25 de façon transitoire. Halfer et al considèrent que les T reg se situent uniquement dans la population CD25^{fort} (Baecher-Allan et al., 2001). D'autres études confirment que l'activité suppressive se trouve uniquement dans la population CD25^{fort} (Makita et al., 2004; Hoffmann et al., 2004), alors que Dieckmann et al retrouvent une expression plus intense de CD25 sur les lymphocytes T activés (Dieckmann et al., 2001). Il est vraisemblable que dans le sang périphérique, il y ait un recouvrement entre les Lymphocytes T reg CD25^{fort}, les lymphocytes T mémoires CD25^{faible} et les lymphocytes T conventionnels activés CD25^{fort} (Godfrey et al., 2004) qui interfèrent avec la purification des lymphocytes Treg. Plusieurs marqueurs ont été associés à ces lymphocytes T régulateurs : le CD45RO (Baecher-Allan et al., 2001), CD122 (chaîne β du récepteur à l'IL-2) (Wing et al., 2002), CD62L (L-sélectine) (Ermann et al., 2005), CD103 (intégrine $\alpha_E\beta_7$)

(Lehmann et al., 2002) et GTIR (Glucocorticoid-Induced-TNF-R) (Tsaknaridis et al., 2003). Il a été montré qu'au moins une partie des lymphocytes T reg CD4⁺ CD25⁺ exprimait le CTLA-4 (CD152) de façon constitutive aussi bien chez la souris (Takahashi et al., 2000; Read et al., 2000) que chez l'homme (Jonuleit et al., 2001; Dieckmann et al., 2001). Récemment Seddiki et al. ont montré que les lymphocytes T régulateurs CD4⁺ CD25⁺ humains peuvent être distingués des lymphocytes T activés par une faible expression du CD127, la chaîne α du récepteur à L'IL17 (Seddiki et al., 2006).

Le facteur de transcription Foxp3 (forkhead box P3) a été identifié comme un gène majeur pour le contrôle du développement et de la fonction des cellules Treg CD4⁺ CD25⁺ (Fontenot et al., 2003; Sakaguchi et al., 2006). Le rôle de Foxp3 a été révélé chez la souris scurfy, qui développe une maladie auto-immune lymphoproliférative fatale, médiée par les lymphocytes TCD4⁺ (Brunkow et al., 2001); Le défaut génétique responsable de cette maladie a été identifié comme étant une mutation du gène Foxp3 résultant en une protéine tronquée (Brunkow et al., 2001). L'injection de lymphocytes T CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ fait régresser la maladie chez la souris scurfy (Nishimura et al., 2004). Des mutations dans Foxp3 humain, ont été identifiées chez des patients atteints de syndrome fatal, sévère, auto-immuns allergique, appelé IPEX (immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (Wildin et al., 2001). Le rôle de Foxp3 dans la genèse des lymphocytes T régulateurs a été démontré par l'analyse de souris chimériques. Des souris irradiées de manière létale ont été reconstituées avec un mélange de cellules hématopoïétiques de moelle osseuse de souris normales et des souris déficientes en Foxp3. Un marquage des cellules de chaque moelle a permis leur rôle dans la reconstitution du système immunitaire de la souris. Seuls les cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse de la souris normale contribuent au développement des Lymphocytes TCD4⁺ CD25⁺ démontrant ainsi le rôle de Foxp3 dans la génération de lymphocytes T régulateurs (Fontenot et al., 2003).

V.3.1.1.2 Mécanismes d'action

Le mécanisme d'action de ces cellules n'est pas toujours clairement établi dans la littérature et reste controversée (von Boehmer, 2005).

Les cellules Treg CD4⁺ CD25⁺ sont réputées, *in vitro*, **hypoprolifératives** en réponse à des stimulations spécifiques ou non spécifiques (Thornton and Shevach,

1998). Elles sont aussi **anergiques** et **suppressifs**. En effet, les lymphocytes Treg CD25⁺ fraîchement isolés du sang périphérique répondent peu à une stimulation allogénique et ne répondent pas à une stimulation polyclonale (Thornton and Shevach, 2000). Par contre, ils suppriment la prolifération de TCD4⁺ CD25⁻ conventionnels en co-culture et pour avoir cette action suppressive, les lymphocytes TCD4⁺ CD25⁺ (T reg) doivent être stimulés via leur **TCR** (Shevach, 2001; Shevach et al., 2001; Thornton and Shevach, 2000): la phase d'induction est donc **dépendante de l'antigène**. Une fois stimulés, ils inhibent les autres lymphocytes T de façon indépendante de l'antigène, c'est-à-dire que la suppression est indépendante de la spécificité antigénique des lymphocytes T (Thornton and Shevach, 1998). Par contre, l'inhibition in vitro est strictement dépendante d'un **contact cellulaire** avec la cellule effectrice CD25⁻ et indépendante de sécrétions cytokiniques (Thornton and Shevach, 2000; Jonuleit et al., 2001). On peut retenir que les Treg exercent leur effet régulateur in vitro par un mécanisme nécessitant un contact cellulaire dont les acteurs ne sont pas encore définis clairement (Shevach et al., 2001; Jonuleit et al., 2001). Mais ces mécanismes ne sont probablement pas univoques puisqu'il a été montré in vivo que des facteurs solubles comme IL-10 et TGF- β sont importants pour l'induction de tolérance par les T reg (Powrie et al., 1994).

La conséquence ultime de la suppression est l'inhibition de la transcription de l'IL-2 dans la population des cellules TCD4⁺ CD25⁻ (Thornton and Shevach, 1998). L'effet suppresseur et l'anergie des TCD4⁺ CD25⁺ peuvent être annulés par l'apport exogène d'IL-2 ou d'IL-15 (Thornton and Shevach, 1998; Jonuleit et al., 2001; Dieckmann et al., 2001).

Le fait que l'effet suppresseur soit uniquement observé suite à l'activation des cellules suggère que l'activation du TCR induit l'expression de protéines permettant l'activité suppressive (McHugh et al., 2002). Les études utilisant des anticorps neutralisant ont montré le rôle de facteurs solubles, comme L'IL-10 (Asseman et al., 1999) et le TGF- β (Read et al., 2000). Ces données sont controversées par d'autres auteurs qui ne mettent pas en évidence le blocage de l'activité suppressive en neutralisant les cytokines IL-10, IL-4 et TGF- β (Kingsley et al., 2002; Thornton and Shevach, 2000; Ng et al., 2001). Il semble maintenant acquis que le mécanisme d'action des lymphocytes TCD4⁺ CD25⁺ implique un contact cellulaire entre la cellule régulatrice et la cellule T cible.

Les Treg expriment fortement le CD25 et plusieurs marqueurs de surface tels que CD62L, CTLA4, CD103, GITR ou HLA-DR chez l'homme (Sakaguchi, 2004). Le facteur de transcription Foxp3 semble être un marqueur essentiel pour les cellules régulatrices (Treg). Il servirait de régulateur du développement (Kim and Rudensky, 2006) et de la fonction de leur fonction suppressive (Fontenot et al., 2003; Sakaguchi et al., 2006).

Des travaux publiés ont montré le rôle important du facteur Foxp3 dans l'obtention des cellules CD4⁺ CD25⁺ naturelles. En effet, la transfection de cellules CD4⁺ CD25⁻ avec le facteur de transcription Foxp3 (forkhead transcription factor box P3) les transforme en cellules CD4⁺ CD25⁺ à caractère suppressif (Fontenot et al., 2003). En conclusion, le marqueur Foxp3 est restreint aux cellules régulatrices CD4⁺ CD25⁺ naturelles mais peut être exprimé par les cellules CD4⁺ CD25⁺ induites en périphérie (Fontenot and Rudensky, 2005).

V.3.1.2 Les autres cellules régulatrices naturelles

Bien que la molécule CD25 soit le principal marqueur utilisé pour identifier les cellules Treg CD4⁺ naturelles, d'autres marqueurs ont été décrits, tels que CD45RB ou RC^{low} (RB chez la souris et RC chez le rat) ou CD62L (L-sélectine).

Les cellules CD45RB ou RC^{low} ont été impliquées dans le contrôle du développement de maladies auto-immunes multi-organes (Powrie and Mason, 1990), de la colite (Powrie et al., 1993), du diabète (Fowell and Mason, 1993), de la thyroïdite (Seddon and Mason, 1999) et dans la prévention du rejet de greffe (Hara et al., 2001), et les cellules CD62L ont été impliquées principalement dans le contrôle du diabète (Seddon et al., 1996).

Il est important de noter que ces trois marqueurs (CD25, DC45RB/RC^{low} et CD62L) ne permettent pas de distinguer trois populations cellulaires distinctes ; au contraire, une forte proportion des cellules CD45RB/RC^{low} et des cellules CD62L sont CD25⁺.

Le CD62L est une molécule d'adhésion appartenant à la super famille des sélectines, et qui joue un rôle important dans la migration des lymphocytes au niveau des ganglions lymphatiques. Cette molécule est exprimée de façon constitutive à la surface de la plupart des lymphocytes T et B activés (Lewinsohn et al., 1987). Les cellules CD4⁺ CD62L sécrètent peu d'IFN γ , peu d'IL-2, pas d'IL-10 et d'IL-4 (Alyanakian et al., 2003). Il a été montré que ces cellules CD4⁺ CD62L⁺ sont à la fois dans la population

CD4⁺ RB^{high} et CD4⁺RB^{low} et que 50 à 60% de la population CD4⁺ CD25⁺ est CD62L⁺. Les cellules CD25⁺ CD62L⁺ semble avoir aussi une importante capacité suppressive par rapport aux cellules CD4⁺ CD25⁺ CD62L⁻ (Fu et al., 2004).

Une population de cellules Treg naturelles a été décrite dans le compartiment CD8⁺ chez le rat (Xystrakis et al., 2004). Ces cellules sont CD45RC^{low} et leur activité régulatrice a été confirmée in vivo dans un modèle de GVHD chez le rat.

V.3.2 Les cellules régulatrices induites

Ces cellules appelées Treg induites, ou encore « acquise » ou « adaptatives » sont induites par un antigène, et leur capacité suppressive est spécifique de cet antigène.

V.3.2.1 Les cellules Th3

Ces cellules Th3 (cellules sécrétrices du TGFβ), retrouvées chez l'homme et décrites dans plusieurs modèles animaux forment une sous-population unique de lymphocytes qui sécrètent de grandes quantités de TGFβ (Mills and McGuirk, 2004; Taams and Akbar, 2005; Zheng et al., 2002). L'activité suppressive des cellules de sous- type Th3 est inhibée par l'ajout d'un anticorps anti- TGFβ, suggérant que l'activité suppressive de ces cellules est principalement médiée par cette cytokine (Cottrez and Groux, 2004).

Les cellules régulatrices de type Th3 possèdent une capacité suppressive sur les cellules Th1 et Th2, et jouent un rôle important dans le développement des maladies auto-immunes (Faria and Weiner, 2005). La différenciation in vitro des cellules de sous- type Th3 est obtenue en présence du TGFβ, d'IL-10, d'un anticorps anti IL-12, et d'IL-4 (Zheng et al., 2002).

In vivo, l'induction de population de sous-type Th3 suite à l'administration d'antigènes par voie orale est augmentée par l'administration orale de l'IL-4. En revanche,

l'injection d'un anticorps anti CD86 mais pas l'anticorps anti CD80 empêche l'apparition des cellules de type Th3 normalement induite par l'administration orale d'antigène, ce qui démontre le rôle important de certaines molécules de costimulation dans la génération de cette population (Weiner, 1997). Récemment, une étude publiée dans un modèle murin a démontré que l'expression de Foxp3, la taille du compartiment en Treg et l'activité suppressive étaient dépendants de signaux induits par le TGFβ dans les T régulateurs (Marie et al., 2005).

V.3.2.2 Les cellules régulatrices 1 (Tr1)

Les cellules régulatrices Tr1 sont des cellules CD4⁺ qui sécrètent peu d'IL-2, pas d'IL-4, des quantités importantes d'IL-10 (Battaglia et al., 2006), et des quantités modérées de TGFβ, l'IL-5 et d'IFNγ. Elles sont capables d'inhiber l'activation des cellules naïves principalement par la sécrétion d'IL-10 et de TGFβ (Bacchetta et al., 2005; Battaglia et al., 2006). Ces cellules peuvent être générées in vivo et in vitro en présence d'IL-10 (Groux et al., 1997; O'Neill E et al., 2004; Sundstedt et al., 2003). Le mécanisme de suppression exercée par les cellules Tr1 est dépendant du contact cellulaire même si les expériences utilisant des systèmes de culture en chambres séparées montrent que l'effet suppresseur est médié, au moins partiellement par les facteurs solubles (Groux, 2003). Les cellules Tr1 inhibent des réponses immunitaires de type Th1 et de type Th2 impliquées dans de nombreuses pathologies (Bacchetta et al., 2005).

Chez l'homme, des cellules générées en présence d'IL-10 et d'IFNα, sont capables d'inhiber la réponse des cellules CD4⁺ autologues naïves contre des alloantigènes par un mécanisme dépendant de l'IL-10 et du TGFβ (Levings et al., 2001). Enfin, l'activité suppressive de ces cellules semble jouer un rôle important dans le maintien de la tolérance en périphérie et le développement des maladies auto-immunes (Jiang and Lechler, 2003).

V. 3.2.3 Les cellules T régulatrices CD8⁺

De façon similaire a ce qui a été décrit pour les Lymphocytes TCD4⁺, il a été mis en évidence, parmi les lymphocytes TCD8, une population de cellules régulatrices qui inhibent les lymphocytes TCD4⁺ par sécrétion d'IL-10 (Gilliet and Liu, 2002a;

Dhodapkar et al., 2001). Plusieurs types de cellules TCD8⁺ ont été décrits à ce jour, les lymphocytes T CD8⁺ CD45RC^{low}, les LT CD8⁺ CD28⁻ et les LT CD8⁺ CD103⁺. Récemment, notre laboratoire a montré que le blocage de la voie CD40/CD40L permettait la génération de cellules régulatrices TCD8⁺CD45C^{low} capables de tolérance infectieuse dans le modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat (Guillonnet et al., 2007). Auparavant, les travaux de Saoudi et al ont démontré, pour la première fois chez le rat, l'existence d'une sous population de lymphocytes T CD8⁺ avec des capacités régulatrices (Xystrakis et al., 2004). L'expression de CD45C a permis de distinguer 2 types de sous-populations chez le rat : CD45RC^{high} et CD45RC^{low}. Ils ont démontré que les cellules CD8⁺ CD45RC^{low} fraîchement isolées ont des propriétés régulatrices, ne sont pas cytotoxiques, produisent des cytokines de type Th2 (IL-4, IL-10 et IL-13) expriment sélectivement Foxp3 et CTLA-4 et inhibent les réponses immunitaires alloréactives à la fois in vitro et in vivo. Les fonctions régulatrices et les mécanismes d'action de ces cellules sont liés à une inhibition de l'expression des cellules effectrices CD4⁺ Th1. De plus, cette régulation requiert des contacts cellulaires et non une action dépendante des cytokines (Xystrakis et al., 2004).

D'autre part, chez l'homme, Cosmi et al ont caractérisé une population de thymocytes CD8⁺ CD25⁺ avec un phénotype, des caractéristiques fonctionnelles et un mécanisme d'action équivalent aux cellules TCD4⁺ CD25⁺ (Cosmi et al., 2003).

L'effet suppresseur des cellules TCD8⁺ CD28⁻ passe par une tolérogénéisation des CPA professionnelles (cellules dendritiques) et semi professionnelles (cellules endothéliales) qui induisent ensuite l'anergie des lymphocytes T helper (Chang et al., 2002; Manavalan et al., 2004). Ces cellules suppriment les réponses spécifiques de l'antigène en inhibant la production d'IL-2 et l'expression de CD80 et de CD86 par les CPA (Colovai et al., 2000).

Des cellules CD8⁺ régulatrices peuvent également être induite par l'administration orale d'antigènes. En effet, l'administration orale d'auto-antigène permet le développement de des CD8⁺ régulatrices produisant de forte quantité de TGFβ et capables de protéger contre le développement de maladies auto-immunes (Mowat et al., 2004).

En plus de ces cellules régulatrices, il existe d'autres cellules régulatrices CD4⁻ comportant les cellules NK (Homann et al., 2002), les cellules NK T (Hammond et al., 1998), les cellules CD8⁺ (Garba et al., 2002), les cellules CD4⁻ CD8⁻ (Fischer et al., 2005; Zhang et al., 2001).

Récemment, on parle du rôle de TGF- β dans l'induction de cellules T régulatrices pour prévenir l'auto-immunité. En effet, en présence d'IL-6, le TGF- β pourrait induire la différenciation des lymphocytes T naives en cellules Th17 productrices de la cytokine pro-inflammatoire IL-17 (Mucida et al., 2007). En effet, Les cytokines telles que TGF β , l'IL-6, IL-1 et l'IL-23 peuvent jouer sur le développement de ces cellules Th17 (Veldhoen et al., 2006). Il semble en effet que l'IL-23 serait plus importante dans la survie et l'expansion de cellules Th17 plutôt que leur génération (Veldhoen et al., 2006). L'IL-23 interviendrait donc dans la stabilisation des cellules Th17 et L'IL-21 dans leur amplification (Bettelli et al., 2007). A l'inverse, l'IL-27 a été décrite comme inhibant le développement des cellules Th17 (Batten et al., 2006; Stumhofer et al., 2006). La réponse immune de TGF- β , dépend de l'acide rétinoïque qui agit comme un régulateur et est capable d'inhiber l'IL-6 nécessaire à la différenciation des cellules Th17 proinflammatoires et induire la différenciation des cellules T reg anti-inflammatoires.

V.4 Induction des lymphocytes T régulateurs par les DC

L'activation et/ou la différenciation des cellules régulatrices naturelles en périphérie semble être possible suite à leur interaction avec les DC. Par ailleurs, les DC sont présentes dans les tissus périphériques où elles peuvent capturer des antigènes. Ces antigènes sont transportés par les DC dans les organes lymphoïdes secondaires, comme les ganglions lymphatiques et la rate, et y sont présentés aux cellules T. En l'absence d'infection ou d'inflammation, les DC sont alors à l'état de repos. L'apoptose est un phénomène non inflammatoire (Pittoni and Valesini, 2002) et les corps apoptotiques qui en résultent sont rapidement éliminés par les macrophages et les DC. Les auto-antigènes ainsi libérés lors de l'apoptose sont capturés par les macrophages qui assurent une fonction d'élimination. De façon complémentaire, les DC immatures participent à l'élimination des corps apoptotiques

(Sauter et al., 2000) et pourraient assurer la tolérisation des lymphocytes auto-réactifs (Steinman et al., 2000), soit par la délétion des cellules TCD8⁺ pathogènes (Heath and Carbone, 2001) soit par l'activation des lymphocytes TCD4⁺ régulateurs (Mahnke et al., 2002). Jonuleit et al ont montré que la stimulation répétée des lymphocytes T naïfs humains, in vitro, en présence de DC immatures allogéniques, permet leur différenciations en lymphocytes T de phénotype CD4⁺ CD25⁺ CTLA-4⁺, caractérisés par la production de quantité importante d'IL-10 et leur faible capacité proliférative (Jonuleit et al., 2000). Leur activité régulatrice dépend du contact cellulaire. Leving et al ont montré qu'il était possible de générer des cellules de type Tr1 en stimulant de façon répétée des cellules mononuclées du sang périphérique par les DC immatures allogéniques (Levings et al., 2005). L'activité suppressive des ces cellules Tr1 dépend de leur sécrétion d'IL-10 et de TGFβ. Toujours chez l'homme, il a été montré que l'injection de DC immatures par voie sous-cutanée entraîne l'induction de cellules TCD8⁺ spécifiques de l'antigène(Dhodapkar and Steinman, 2002), on peut obtenir aussi des cellules T reg CD8⁺ sécrétrices d'IL-10 avec des cellules dendritiques plasmacytoides activés par CD40L et utilisées comme cellule APC (Gilliet and Liu, 2002b), ou encore des cellules Treg CDD4⁺ CD25⁺ avec des cellules dendritiques plasmacytoides activées par les CpG (Moseman et al., 2004).

La voie de costimulation ICOS/ ICOSL semble, en outre, directement impliquée dans la génération de ces cellules T régulatrices (Akbari et al., 2002).

Enfin, le traitement des DC in vitro ou in vivo avec des agents biologiques comme l'IL-10 ou pharmacologiques comme les analogues de vitamine D3, serait à l'origine de la génération des lymphocytes T régulateurs (Enk, 2005); (Penna et al., 2005). Le plus souvent ces traitements empêchent la maturation des DC par l'inhibition de la voie NF-κB (Rutella and Lemoli, 2004). Ces DC sécrètent préférentiellement de l'IL-10 au lieu de l'IL-12 et induisent des lymphocytes régulateurs (Mahnke and Enk, 2005).

Objectif de l'étude

Ce travail a été réalisé à l'institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation (ITERT) dirigé par le professeur Jean Paul Soulillou. La thématique principale du laboratoire (Inserm U643) est la compréhension des mécanismes conduisant au rejet et à la tolérance des organes transplantés. Une partie importante de la recherche fondamentale y est réalisée sur le modèle du rat qui permet la mise en place facilitée de modèles de transplantation d'organes.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les DC jouent un rôle fondamental dans la régulation des réponses immunitaires et dans le maintien de la tolérance périphérique. Les DC sont les principales cellules présentatrices de l'antigène aux lymphocytes T car

ce sont les seules cellules présentatrices capables de stimuler les cellules T naïves (Banchereau and Steinman, 1998). Elles jouent donc un rôle central dans l'initiation des réponses immunitaires contre les allogreffes et récemment leur rôle majeur dans la tolérance des cellules T a également été démontré (Steinman and Nussenzweig, 2002). Différentes sous-populations de DC ont été décrites et leurs rôles dans l'activation et l'expansion des cellules T régulatrices est mal connu. Les cellules TCD4⁺ CD25⁺ dites régulatrices naturelles jouent un rôle majeur dans la tolérance périphérique des cellules T contre les antigènes du soi. Des travaux récents indiquent que ces cellules pourraient jouer un rôle central dans la tolérance aux allogreffes chez l'homme et dans de nombreux modèles animaux. Néanmoins les mécanismes d'activation et d'homéostasie de ces cellules in vivo restent largement inconnus. La compréhension de ces mécanismes pourrait permettre d'utiliser le formidable potentiel thérapeutique que représentent les cellules T régulatrices.

L'objectif de notre projet de recherche est de déterminer et de comprendre le rôle potentiel des différentes sous-populations de cellules dendritiques (DC) et notamment des DC plasmacytoides (pDC) dans l'activation et l'expansion de cellules T régulatrices (T reg) allogéniques. Nos résultats préliminaires obtenus chez le rat indiquent que qu'une sous-population de DC, appelée cellule dendritique plasmacytoides (pDC), est capable, contrairement aux autres sous-populations de DC, d'induire une prolifération considérable de cellules T CD4⁺ CD25⁺ allogéniques. Les buts spécifiques de notre projet étaient de :

- 1) Aider à étudier les fonctions des populations de DC spléniques chez le rat identifiées selon le type de pathogène (les ligands de TLR) qu'elles peuvent rencontrer. Nous verrons que ces populations de DC spléniques (DC CD4⁺, DC CD4⁻ et pDC) possèdent in vitro des profils d'expression de TLR, de production de cytokines et de stimulation T différentes.
- 2) Caractériser les cellules T régulatrices de rat et comparer leur phénotype avec celui de l'homme.
- 3) Déterminer si les cellules T CD4⁺ CD25⁺ stimulées in vitro par des pDC conservent in vitro une activité suppressive et si celle-ci est spécifique. Nous analyserons également les mécanismes de cette activité suppressive.

Enfin, nous essayerons de produire ex vivo de grandes quantités de cellules T régulatrices spécifiques d'alloantigènes par stimulation par des DC plasmacytoides afin de tester leur potentiel suppresseur in vivo chez des animaux receveurs d'une allogreffe cardiaque. Ce travail pourra permettre de mieux comprendre les mécanismes de régulation des cellules T CD4⁺ CD25⁺ et d'envisager des méthodes d'expansion ex vivo de cellules régulatrices à des fins thérapeutiques.

Résultats

I. Article 1

**Les populations de cellules dendritiques du rat
expriment différemment les PRR (Pattern
Recognition Receptor) et répondent
différemment aux ligands des PRR**

Par : François-Xavier Hubert, Cécile Voisine, Cédric Louvet,
Jean- Marie Heslan, **Asmahan Ouabed**, Michèle Heslan, et Régis
Josien

Publié dans : *The Journal of Immunology*, 2006, 177 : 1007-1016

I.1 Résumé de l'article 1

Les cellules dendritiques (DC) sont une population hétérogène de CPA possédant des fonctions spécifiques. La nature de la population de DC impliquée au cours de la réponse immune spécifique aux pathogènes semble importante pour la l'induction d'une réponse effectrice appropriée. En plus, chaque population de DC possède une plasticité fonctionnelle intrinsèque. Chez le rat, les DC spléniques peuvent être séparées en trois populations selon leur morphologie et leur phénotype, à savoir les DC CD4⁺, CD4⁻, et les DC plasmacytoïdes (pDC). Nous avons corrélé l'expression des TLR et NOD2 (Nucleotide-binding oligomerization domain 2) de ces populations de DC à leur capacité de réponse, in vitro, aux ligands spécifiques. Les DC CD4⁻ expriment de forts niveaux d'ARNm des TLR 1, 2, 3, et 10, peu de TLR 4, 5, 6, 7, et 9, et très peu de TLR 8. Les pDC ont un répertoire restreint caractérisé par des niveaux élevés des TLR 7 et 9. Les DC CD4⁺ expriment tous les TLR et 10 fois plus d'ARNm de NOD-2 que les DC CD4⁻ et les pDC. Après stimulation par les ligands TLR et NOD2, chaque population de DC présente une réponse stéréotypée. Les TLR2/6, 3, 4, 5, 9, et NOD2 induisent la maturation des DC CD4⁻ et leur capacité à produire fortement de l'IL-12p40, faiblement de l'IL-10, et du TNF- α . Les TLR 7/8 et 9 induisent les pDC à devenir matures et à produire de grandes quantités d'IL-6, IL-12p40, et TNF- α et peu IFN- α . Les DC CD4⁺ sont de très faibles productrices de cytokines inflammatoires. Cette étude suggère que la nature de la réponse des DC spléniques aux pathogènes est dépendante de leur stimulation spécifique plutôt que de leur plasticité intrinsèque.

Differential Pattern Recognition Receptor Expression but Stereotyped Responsiveness in Rat Spleen Dendritic Cell Subsets¹

François-Xavier Hubert, Cécile Voisine,² Cédric Louvet,³ Jean-Marie Heslan, Asmah Ouabed, Michèle Heslan, and Régis Josien⁴

Dendritic cells (DC) are a heterogeneous population of APC endowed with specific functions. The nature of the DC subset involved in the course of an immune response to a specific pathogen might be important for inducing the appropriate effectors. In addition, each DC subset might also exhibit intrinsic functional plasticity. In the rat, spleen DC can be separated into three morphological and phenotypic distinct subsets, namely CD4⁺, CD4⁻, and plasmacytoid DC (pDC), whose frequencies are strain dependent. We correlated the expression of TLR and nucleotide-binding oligomerization domain 2 (NOD2) in these DC subsets to their *in vitro* responsiveness to specific ligands. CD4⁻ DC expressed high levels of TLR1, 2, 3, and 10 mRNA, low TLR4, 5, 6, 7, and 9, and very low, if any, TLR8. pDC had a restricted repertoire characterized by high TLR7 and 9. CD4⁺ DC expressed all TLR and 10-fold higher levels of NOD2 mRNA than CD4⁻ and pDC. Upon stimulation by TLR and NOD2 ligands, each DC subset responded in quite a stereotyped fashion. TLR2/6, 3, 4, 5, 9, and NOD2 triggering induced CD4⁻ DC to mature and produce high IL-12p40, low IL-10, and TNF- α . TLR7/8 and 9 triggering induced pDC to mature and produce copious amounts of IL-6, IL-12p40, and TNF- α and low IFN- α . CD4⁺ DC were very poor producers of inflammatory cytokines. This study suggests that the nature of spleen DC responses to pathogens is dependent on subset specific stimulation rather than intrinsic plasticity. *The Journal of Immunology*, 2006, 177: 8222–8230.

Recognition of microbial infection and initiation of host defense responses is controlled by multiple mechanisms. TLR have recently emerged as key components of the innate immune system that detect microbial infection and trigger antimicrobial host defense responses (1). TLR activate multiple steps in the inflammatory reactions that lead to elimination of invading pathogens (2). In addition, TLR control multiple dendritic cell (DC)³ functions and activate signals that are critically involved in the initiation of adaptive immune responses (3). It has become clear that the crucial maturation checkpoint of DC is

tightly controlled at least in part by the innate immune system (4). DC are central to T lymphocyte activation and differentiation into Th1 and Th2 cells (5). DC take up Ags, become activated, and migrate to local lymphoid tissues where they present the antigenic peptides on their MHC molecules (6). This process involves phagocytosis, up-regulation of costimulatory and MHC molecules, secretion of cytokines, and Ag presentation by DC. All of these events are notably regulated through the recognition of pathogens via TLR expressed by DC (4).

Studies of DC subsets isolated from humans and mice have revealed that TLR have distinct expression patterns, indicating that DC subsets have different intrinsic capabilities to recognize and respond to pathogens (7). Human blood contains a subset of CD11c⁺ DC and a subset of CD11c⁻ DC, also known as plasmacytoid DC (pDC) (8). CD11c⁺ DC express TLR1, 2, 3, 5, 6, and 8, whereas pDC express TLR7 and 9 (9). In some studies, TLR7 expression was detected on both pDC and myeloid DC (10), whereas others found TLR7 to be expressed exclusively by pDC (9). These DC subsets exhibit different functions. For example, CD11c⁺ blood DC can produce large amounts of IL-12 upon exposure to specific pathogens or activated T cells and drive the differentiation of Th1 cells. pDC, on the other hand, produce large amounts of type I IFN upon exposure to virus and drive the differentiation of Th2 cells (8). However, the Th cell differentiation capacity of human DC subsets seems to depend on the nature of the stimulus (11, 12). In rodents, most knowledge of DC comes from studies of DC isolated from lymphoid organs. Thus, in mice, four DC subsets have been described so far: CD11b⁺CD4⁺CD8⁻ DC, CD11b⁺CD4⁻CD8⁺ DC, CD11b⁺CD4⁻CD8⁻ DC, and pDC (13, 14). All splenic DC subsets express TLR1, 2, 4, 6, 8, and 9 mRNA (15). However, CD8⁺CD4⁻ DC express high TLR3, lack TLR5 and 7 expression and fail to respond to TLR7 ligands, whereas CD8⁻ DC lack TLR3 (16). The latter study suggests that

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité 643, Centre Hospitalo-Universitaire Nantes, Hôtel Dieu, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation (ITERT), and Université de Nantes, Unité de Formation et de Recherche de Médecine, Nantes, France.

Received for publication February 3, 2006. Accepted for publication April 28, 2006.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹This work was supported by INSERM, the Progreffe Foundation, and by a grant from the "Association pour la Recherche sur le Cancer" (ARC 9601100 R.T.S.F.-S.H.) was supported by INSERM and the "Région des Pays de la Loire" and C.V. by "La Ligue Nationale contre le Cancer." The high speed cell sorter used in this study was purchased using a gift from the Centre Régional de Crédit Agricole Mutual Atlantique Vendée.

²Current address: Division of Parasitology, National Institute for Medical Research, The Ridgeway, Mill Hill, London NW7 1AA, U.K.

³Current address: Diabetes Center, 515 Farmington Avenue, HSW 1102, Box 0940, San Francisco, CA 94143.

⁴Address correspondence and reprint requests to Dr. Régis Josien, INSERM U643, ITERT, CHU Hôtel Dieu, 30 boulevard Jean Morand, 44095 Nantes Cedex 1, France. E-mail address: Regis.josien@univ-nantes.fr

⁵Abbreviations used in this paper: DC, dendritic cell; IFN, Brown Norway; HELM, heat-killed *Mycobacterium neoaurum*; HERT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase; IRAK4, IL-1R-associated kinase-4; MHC I, MHC class I; NOD2, nucleotide-binding oligomerization domain 2; ODN, oligonucleotide; pDC, plasmacytoid DC; IgG, poly(I:C); poly(I:C), polyinosinic-polycytidylic acid; PRR, pattern recognition receptor; SP2, Spangue Dowsley; TRAF3, TNFR-associated factor 3.

the TLR repertoire of murine pDC is not as restricted as it is in humans (16), although a recent study suggested a preferential expression of TLR7 and 9 (17). The functions of these subsets in mice also appeared different (reviewed in Ref. 7), with CD8⁺CD4⁻ DC being the strongest IL-12 producers and Th1 inducers together with having a strong Ag cross-presentation capacity, whereas CD8⁻CD4⁺ or CD4⁺ DC do not produce IL-12 and promote Th2 or Th0 differentiation (18, 19). The capacity of pDC to produce very large amounts of type 1 IFN has been conserved between mice and humans, although murine but not human pDC have been shown to produce IL-12p40 (20).

We and others have described three subsets of DC in the rat spleen: CX62⁺CD11b⁺CD4⁺SIRP α ⁺ DC referred to as CD4⁺ DC, CX62⁺CD11b⁺CD4⁻SIRP α ⁻ DC (CD4⁻ DC) (21–23), and CX62⁻CD11b⁻CD4⁺SIRP α ⁺ DC that are the rat counterpart of pDC (24). Like human pDC, rat pDC are characterized by a strong and rather restricted expression of TLR7 and 9 and a strong responsiveness to CpG oligonucleotide (ODN), the natural ligands of TLR9 (24). We have additionally shown that CD4⁻ DC are the main producers of IL-12 and that type 1 IFN production is restricted to pDC (24, 25). CD4⁺ DC are also endowed with two specialized functions: a potent cell contact-dependent cytotoxic activity *in vitro*, mainly toward tumor cells (22) and the capacity to phagocytose apoptotic cells *in vitro* (26). In the present study, we sought to determine the expression repertoire of major pattern recognition receptors (PRR), including nucleotide-binding oligomerization domain 2 (NOD2), in rat spleen DC subsets using a highly sensitive and quantitative PCR method and to correlate this to the *in vitro* responsiveness of these subsets to specific PRR ligands. We found that each DC subset expressed a specific TLR repertoire and that their *in vitro* response to TLR ligands led to be stereotyped.

Materials and Methods

Animals

Spague Dawley (SPD), Lewis, and Brown Norway (BN) rats were obtained from the Centre d'Élevage Janvier and were used when 6–10 wk old. The study has been approved by our Institutional Review Board.

Reagents

The murine CD40L-human CD8 fusion molecule (superantigen of 509 insect cells transfected using a recombinant baculovirus) was provided by Prof. Y. Choi (Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA). Polyinosinic-polycytidylic acid (poly(I:C)), monensin, and brefeldin A were obtained from Sigma-Aldrich. The phosphodiester CpG ODN 2006 (heptagttttgctgtttgggt) was synthesized by Sigma-Genosys. Heat-killed *Listeria monocytogenes* (HKL.M), peptidoglycan (PGN), flagellin, and R848 were purchased from InvivoGen.

Antibodies

A number of hybridomas were obtained from the European Collection of Cell Culture, and the corresponding mAbs were purified from supernatants in our laboratory with certain being coupled to FITC (Biosearch) or to AlexaFluor 488 or AlexaFluor 647 (kit from Invitrogen-Molecular Probes). Alternatively, FITC-conjugated anti-CD8 (clone G4-18), PE-conjugated anti-CD45R (clone HIS24), PerCP-cyanin 5.5-conjugated anti-CD11b (clone WT5), PE-cyanin 7-conjugated anti-CD4 (clone CX35), allophycocyanin-Cy7-conjugated anti-MHC class II (MHC II) (clone OX6), FITC-conjugated anti-B7-2 (clone 24F), and PE-conjugated anti-B7-1 (clone 3H5) mAbs were purchased from BD Pharmingen. FITC-conjugated anti-IgD (MARCB) was purchased from Technopharm.

Cytofluorescence analysis

Cells were stained as previously described (25) and analyzed using a FACSCalibur or a FACSAria cytometer (BD Biosciences).

Cells

Dendritic cells. Spleens were minced and digested in 2 mg/ml collagenase D (Roche Diagnostics) in RPMI 1640/10% FCS for 15 min at 37°C. EDTA at 10 mM was added for the last 5 min, and the cell suspension was then pipetted up and down several times and filtered. Cells were separated into high-density cells (containing most of the pDC) and low-density cells (containing most of the CX62⁺CD11b⁺ DC) using a 14.5% Nycodenz (Bioscience) gradient centrifugation as described previously (25). CD11b⁺CX62⁺CD4⁻ and CD11b⁺CX62⁺CD4⁺ subsets of spleen DC were isolated by FACS from low-density spleen cells. Cells were stained with TCRA β -FITC (clone R73), CD45R-FITC (clone HIS24), CD4-PE (clone CX35), and CD103-Alexa 647 (clone OX62) mAbs. CX62⁺CD4⁻ and CX62⁺CD4⁺ cells were then sorted on a FACSAria (BD Biosciences) after excluding FITC⁺ cells (see Fig. 2A). Purity was routinely >97 and >98%, respectively, for CD4⁻ and CD4⁺ DC. pDC were isolated from high-density spleen cells after removal of RBC. T and partial B cell depletion was first performed by incubating cells with anti-TCRA β and β 2 mAbs (clone R73 and V β 5, respectively), followed by a mixture of anti-mouse and anti-rat IgG-coated magnetic beads (Dyna Beads). Cells were then stained with TCRA β -FITC (clone R73), CD45RA-FITC (clone OX35), CD11b β -FITC (clone OX42), CD45R-PE (clone HIS24), and CD4-AlexaFluor 647 (clone CX35) mAbs, and CD45R⁺CD4⁺ were sorted on a FACSAria after excluding FITC⁺ cells (see Fig. 2A). Purity was routinely >97.5%.

T cells. Lymph node T cells were prepared using nylon wool columns. CD4⁺ T cells were then obtained by negative selection of MHC class II⁺ and CD8⁻ cells using specific mAbs (clone OX6 and clone OX8, respectively), followed by anti-mouse IgG-coated magnetic beads (Dyna Beads). Purity was routinely \geq 98%.

Mononuclear cells. PBMC were cultured for 90 min at 3×10^6 /ml in petri culture dishes in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) supplemented with 2 mM α -glutamine, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, 1 mM sodium pyruvate, 1 mM HEPES, 5×10^{-5} M 2-ME, and 10% FCS (referred to as complete RPMI 1640). Nonadherent cells were removed by extensive washing with prewarmed medium. Adherent monocytes were then directly lysed in TRIzol solution for mRNA extraction.

Adoptive leukocyte reaction

A total of 2×10^4 allogeneic DC was cultured with 1×10^5 purified CD4⁺ T cells in round-bottom 96-well plates in a final volume of 200 μ l of complete RPMI 1640. After 4 days at 37°C in 5% CO₂, cultures were pulsed for the last 8 h with 0.5 μ Ci [³H]TdR per well (Amersham Biosciences). The cells were then harvested onto glass fiber filters, and [³H]TdR incorporation was measured using standard scintillation procedures (Beckman Instruments).

Cytokine production

Stimulation of isolated DC subsets for cytokine production. Sorted splenic CX62⁺CD4⁻ DC, CX62⁺CD4⁺ DC, and pDC were stimulated at 1×10^6 /ml (2×10^4 cells in 200 μ l) in complete RPMI 1640 in 96-well plates. After 24 h, supernatants were collected and stored at -20°C until analysis. Stimuli were used at the following concentrations: HKLM⁺ (10⁷ ml); PGN (10 μ g/ml); poly(I:C) (25 μ g/ml); LPS (0.5 μ g/ml); flagellin (100 ng/ml); R848 (1 μ g/ml); and CpG ODN 2006 (10 μ M). For cytokine production, including type 1 IFN, the results are expressed as amount of cytokine for 1×10^6 cells/ml.

IFN- α bioassay. A total of 1×10^5 Cf6 cells (rat glioma tumor cell line) was cultured overnight in 100 μ l of DMEM (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% FCS, 2 mM α -glutamine, 100 U/ml penicillin, and 0.1 mg/ml streptomycin in flat-bottom 96-well plates in the presence or absence of a rat IFN- α reference standard (R&D Systems) or supernatants. The supernatants were then removed and the cells were infected with vesicular stomatitis virus (provided by Dr. A. Ruffank, Centre Hospitalo-Universitaire Régional Pictou-Chalou, Lévesque, France) in a final volume of 100 μ l of complete DMEM for 18 h at 37°C. The wells were then washed with 100 μ l of Earle's balanced salts (Sigma-Aldrich) and incubated with 100 μ l of 5% Formalin for 10 min at room temperature, followed by 100 μ l of crystal violet solution. Plates were examined visually and reciprocal titers of IFN- α (expressed as units per milliliter) were deduced by comparison with the reference standard.

ELISA test. The levels of IL-10 and TNF- α in the supernatants were measured using OptEIA rat ELISA kits from BD Pharmingen according to the manufacturer's instructions. Rat IL-12p40 and IL-12p70 were detected using ELISA kits from BioSource International, and IL-6 was measured using an ELISA kit from R&D Systems.

Quantitative RT-PCR

The cDNA sequences used in this study are described in Table I and II.

Standard construction

For TLR and hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) genes, the target sequence was amplified by PCR from a spleen cDNA library, then electroporated and purified by phage-cloneform extraction and ethanol precipitation. Subsequent dilutions of this standard DNA were performed to obtain 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , and 10^3 copies/well.

RNA extraction

Total RNA from 3×10^6 to 2×10^8 resting or stimulated spleen cells, OX62⁺CD4⁺, OX62⁺CD4⁺ DC, pDC, and blood monocytes were prepared by TRIzol extraction (Invitrogen Life Technologies). Genomic DNA was removed by DNase treatment (Invitrogen Life Technologies), and reverse transcription was performed as described previously (25).

Real-time quantitative PCR

For NO2, MyD88, TRAF6, and IRAK4 analysis, real-time quantitative PCR was performed using an Applied Biosystems GeneAmp 7700 Sequence Detection System with SYBR Green PCR Core Reagents (Applied Biosystems). Total cDNA was amplified in 25 μ l of PCR mix containing 300 nM of each primer (Table II), 200 μ M dATP, dGTP, and dCTP, 400 μ M dUTP, 3 mM MgCl₂, 0.25 U of uracil-N-glycosylase, 0.625 U of AmpliTaq Gold DNA polymerase, and 2.5 μ l of the Exo SYBR Green buffer. The reaction started with a step of 2 min at 55°C to allow the uracil-N-glycosylase to eliminate putative PCR contaminants, followed by 10 min at 95°C to activate the AmpliTaq Gold DNA polymerase, and then 40 cycles each consisting of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. For TLR analysis, real-time quantitative PCR was performed using TLR1-10-labeled TaqMan probes (Table I). Target transcripts and standard dilutions were amplified in a 25- μ l reaction PCR mix containing 11 μ l of diluted cDNA, 12.5 μ l of TaqMan Universal 2x PCR Master Mix (Applied Biosystems), including AmpliTaq Gold DNA polymerase, dNTPs with dUTP and optimized buffer components, and 1.25 μ l of 20x TaqMan probe and primer (Table I). Before the PCR cycle, samples were subjected to 50°C for 2 min, then at 95°C for 10 min. The step-cycle program was set for denaturing at 95°C for 15 s, and annealing and extension at 60°C for 1 min, for a total of 40 cycles (ABI Prism 7700 sequence detection system; Applied Biosystems).

Analysis

Direct detection of PCR products was monitored by measuring increase in fluorescence. For TLR, the exact number of copies was deduced by comparison of the measured fluorescence with the standard curve. For NO2,

MyD88, TRAF6, and IRAK-4 mRNA, relative expression (AU, arbitrary units) was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method as described previously (27).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the Student's *t* test.

Results**Definition and frequencies of spleen DC subsets**

To determine the frequencies of spleen DC subsets in three different rat strains, we used six-color flow cytometry on collagenase-digested total spleen leukocytes. Cells were stained with CD3-FITC, anti-IgD-FITC, CD45R-PE, CD11b-PerCP-Cy5.5, CD4-PE-Cy7, OX-62-allophycocyanin, and MHC II-allophycocyanin-Cy7 mAbs (Fig. 1A). After gating on CD3⁺IgD⁺MHC II⁺ cells, spleen cells were separated into CD11b⁺ and CD11b⁻ populations. Due to the lack of an exclusive and homogeneous marker for rat B cells, the gating on CD3⁺IgD⁺MHC II⁺ cells was not sufficient to eliminate all B cells. Therefore, MHC II⁺CD11b⁺ cells were further gated on CD45R⁻ cells to exclude residual B cells (data not shown) and analyzed for the expression of OX62 and CD4. As we have previously shown (22, 25), two DC populations were defined (Fig. 1A): OX62^{hi}CD4⁺ (gate B, referred to as CD4⁺ DC) and OX62^{lo}CD4^{hi} (gate C, referred to as CD4⁺ DC). MHC II⁺CD11b⁺ cells were OX62⁻ and contained a population of CD45R⁺CD4^{hi} cells (gate A) that we have previously shown to be the rat counterpart of pDC (24).

The frequencies of pDC exhibited large strain-dependent variations (Fig. 1B). This study was performed in three different rat strains, using 6- to 8-wk-old male animals. The average numbers of spleen cells did not significantly differ between rat strains (data not shown). Thus, male Lewis rats exhibited a 3- to 4-fold higher frequency of pDC than SPD and BN ($p = 0.009$ and 0.002 , respectively). The frequency of CD4⁺ DC was significantly lower in Lewis than in BN ($p = 0.0004$), whereas the highest frequency of CD4⁺ DC was found in BN, followed by Lewis and SPD ($p = 0.02$ and 0.01 , respectively). Therefore, the ratio of DC subsets in the rat spleen appears to be strongly strain dependent.

Table I. Sequences of primers and probes used for measuring TLR mRNA expression

Gene	Primers	Sequence	Amplicon (bp)	Probe (FAM/5'NFQ)
Rat TLR1	Forward	CAGCAGCTTCAGCAGTCTTA	82	CCACACATGGCTAAAGC
	Reverse	CAGCCTTAAAGACAGATACAAATGAGA		
Rat TLR2	Forward	CTCTGTGGAGCTCCCTGCTTT	74	CCCTGTGTCATGCTCCCG
	Reverse	AGCTGTCTGGCCGCTCAAC		
Rat TLR3	Forward	CCACTGTGGAGATCCAACTGAGCT	66	ACTTGAGCCATTTGAGG
	Reverse	GAAGTGTATCAGTATCTGTCTCA		
Rat TLR4	Forward	TGCTACAGTTCACCTGGCTTCTG	78	CTCCCTGGCCCTCCCTCG
	Reverse	CTCTGGAGTCTTTGAGGTTGAGG		
Rat TLR5	Forward	CGGCAAGAGAAAGAGCTTAA	61	CTTAAATAGCTGACACTTCC
	Reverse	CAGCCACACCCGCTCTTAA		
Rat TLR6	Forward	AGAACCTTACTCTGCTCCCAAGGAC	79	CTGTCACTAAGCACAAAA
	Reverse	AGTTCAGATGTGGAGTTTGAAGCAACT		
Rat TLR7	Forward	GTTTAACTCTACACATTAAGCTCTCA	75	CATGTGCTGTGGAGATG
	Reverse	TTCTGTGAGGTTTCTCATGTTT		
Rat TLR8	Forward	GCTTTCGCGAGGATCT	75	CAGTGGCCCAAGCAG
	Reverse	CCCAAGACAGTTTCTGCTCTTG		
Rat TLR9	Forward	CCAAAGCCTTGGCAACT	70	CCCAAGCCTTGGCAACT
	Reverse	TGCTCAGAGGAGGCAACT		
Rat TLR10	Forward	CTCCAGATGCTTTAAGGAGGT	90	CAGCCACACACTACTGG
	Reverse	TGAAATGATGAGGAGGTTGAGGA		
Rat HPRT	Forward	ACAGCCCAAAATGCTTAAGTCT	61	TTCAACCAAGCTCTG
	Reverse	CCAGCACTTGGAGAGCTCTT		

Table II. Sequence of primers used for measuring *M2D88*, *TRAF6*, *IRAK4*, and *NOD2* mRNA expression

Gene	Primer	Sequence	Amplification
Rat <i>HPRT</i>	Forward	CCCTGGTCAAGCAATACAGCC	188
	Reverse	TTCTCTGTTTGGACAAACATGA	
Rat <i>M2D88</i>	Forward	CATGCGGACCTCAGCGGAGCA	330
	Reverse	TCTTCGGAAGCAAGCCAGCC	
Rat <i>TRAF6</i>	Forward	TGCTGATTCATAGCCCTGGAT	224
	Reverse	TTCCTGGTTCCTGCTPWTACTG	
Rat <i>IRAK4</i>	Forward	GGACGACGAAGGGATTTG	256
	Reverse	CTGGGAGCAATCGGACCA	
Rat <i>NOD2</i>	Forward	ACAGAGACCTCGACACTGACTG	241
	Reverse	TCAAGAGGACTCGAGGAGC	

Morphological features of spleen DC subsets

To sort spleen DC subsets, spleen cells were first separated into low-density cells that contain most of the OX62⁺ DC and high-density cells that contain most of the pDC (24). OX62⁺OX62⁺CD4⁺ and OX62⁺OX62⁺CD4⁺ DC were then sorted by FACS from low-density cells, whereas CD45⁺CD45⁺ cells (pDC) were sorted from high-density cells after selective depletion of T cells, CD11b⁺ cells, and most B cells (Fig. 2A). Sorted cells were then analyzed by electron microscopy. As shown in Fig. 2B, the three

DC subsets exhibited very different morphological and ultrastructural features. The population of CD4⁺ DC was the most heterogeneous, with the majority of cells presenting a large and irregular shape with rather a small nucleus and a large cytoplasm containing numerous vesicles in which heterogeneous material was sometimes observed. CD4⁺ DC were a homogeneous population of medium-sized cells, with a high nucleus/cytoplasmic ratio, a regular nucleus with dense chromatin and very few cytoplasmic vesicles. The population of pDC was very homogeneous; these cells

FIGURE 1. Gating strategy and frequency of spleen DC subsets in different rat strains. **A**, Gating strategy for the identification of spleen DC subsets. After digestion of spleen leukocytes, cells were stained with CD3-PE-Cy7, anti-IgD-PE-Cy7, CD45R-PE, CD11b-PerCP-Cy5.5, CD4-PE-Cy7, OX62-allophycocyanin, and MHC II-allophycocyanin-Cy7 mAbs. After gating on CD3⁺IgD⁺MHC II⁺ cells (lower left panel), spleen cells were separated into CD11b⁺ and CD11b⁺ populations (lower middle panel). MHC II⁺CD11b⁺ cells were further gated on CD45R⁺ (data not shown) cells and analyzed for the expression of OX62 and CD4 (upper right panel). Two DC populations are found: OX62⁺CD4⁺ (gate B) and OX62⁺CD4⁺ (gate C, MHC II⁺CD11b⁺ cells were analyzed for the expression of CD4 and CD45R (lower right panel). pDC were identified as CD45R⁺CD4⁺ cells (gate A). **B**, Using this gating strategy, the frequency of these three DC subsets were determined in different rat strains. Results are expressed as mean \pm SD of three animals per strain. See the text for results of statistical analysis.

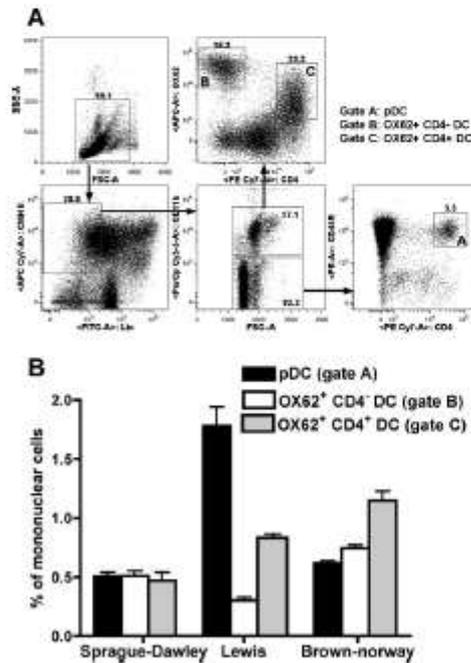
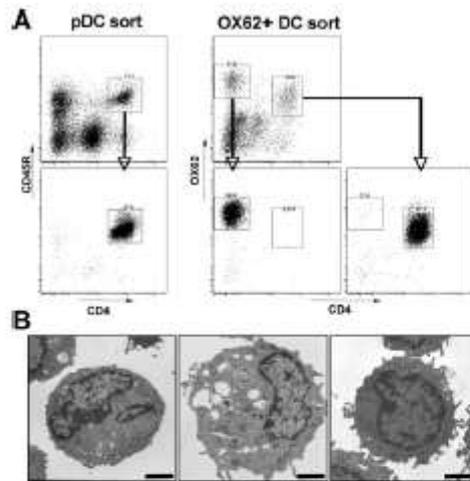


FIGURE 2. Sorting and morphology of splenic DC subsets. **A**, Cells were separated into high-density cells (containing most of the pDC) and low-density cells (containing most of the OX62⁺CD11b⁺ DC). pDC were isolated from high-density spleen cells after removal of RBC, T and partial B cell depletion was first performed by incubating cells with anti-TCR β and $\gamma\delta$ mAbs. Cells were then stained with TCR β -FITC, CD45RA-FITC, CD11b-e-FITC, CD45R-PE, and CD4⁺ Alexa-Fluor 647 mAbs, and CD45R⁺CD4⁺ DC were sorted on a FACS Aria after excluding FITC⁺ cells (*left*). CD11b⁺OX62⁺CD4⁺ and CD11b⁺OX62⁻CD4⁺ subsets of spleen DC were isolated by FACS from low-density spleen cells. Cells were stained with TCR β -FITC, CD45R-FITC, CD4-PE, and CD11b-Alexa 647 mAbs. OX62⁺CD4⁺ and OX62⁻CD4⁺ cells were then sorted on a FACS Aria after excluding FITC⁺ cells (*right*). **B**, Typical morphology of DC subsets from SPD rat as shown by electron microscopy ($\times 5000$).



exhibited a round shape, an eccentric and irregular nucleus, together with a strongly developed endoplasmic reticulum reminiscent of that observed in plasmacytes.

Expression of TLR and NOD2 mRNA in spleen DC subsets

The expression of TLR1–10 mRNA was assessed in spleen DC subsets from SPD rats using real-time quantitative PCR. All TLR mRNA were detected in all DC subsets and in monocytes, but the levels of expression strongly differed. pDC were characterized by a strong expression of TLR7 and 9, a moderate expression of TLR 2, a low expression of TLR4 and 8, and a very low expression of TLR1, 3, 5, 6, and 10 (Fig. 3). In contrast, OX62⁺ DC expressed a much broader repertoire of TLR. CD4⁺ DC expressed high levels of TLR1, 2, 3, and 10, moderate levels of TLR4, 5, 6, 7, and 9, and very low, if any, TLR8. CD4⁻ DC expressed all TLR, with high TLR1, 2, 3, and 7 levels and low TLR4, 5, 6, 8, 9, and 10 levels. The pattern of TLR mRNA expression was also assessed in

blood adherent monocytes, which expressed high levels of TLR1, 2, 5, 6, 7, and 8, low TLR4 and 9 levels, and very low TLR3 and 10. Because the frequencies of DC subsets appeared strain dependent, we determined whether the repertoire of TLR expression was also influenced by the genetic background. This same global profile of TLR expression was found in Lewis and BN strains, with the exception of TLR7 mRNA that exhibited lower expression in CD4⁺ DC from Lewis and BN than from SPD rats (data not shown).

NOD2 was recently found to mediate PGN recognition (28, 29). We found that, like the TLR, NOD2 was differentially expressed in DC subsets from SPD rats, with CD4⁺ DC expressing 10-fold more NOD2 mRNA than CD4⁻ DC and pDC (Fig. 4). The same profile was observed in DC from BN rats (data not shown). Taken together, these data indicate that: 1) CD4⁺ DC have a broader repertoire of PRR mRNA; 2) CD4⁺ and pDC have quite an opposite TLR repertoire; and 3) the PRR repertoire expression in DC subsets is not strain dependent.

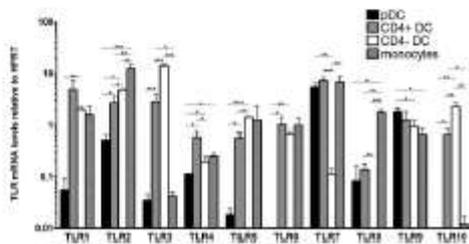


FIGURE 3. TLR expression by splenic DC subsets. The expression of TLR1–10 was assessed in total mRNA prepared from FACS-sorted spleen pDC, CD4⁺ DC, CD4⁻ DC, and peripheral blood adherent monocytes from SPD rats by real-time quantitative PCR. The results are expressed as a ratio of TLR to HPRT mRNA expression and represent the mean \pm SD of three independent experiments for pDC, CD4⁺ DC, CD4⁻ DC, and monocytes. Very similar profiles were observed with Lewis and BN DC subsets (data not shown). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

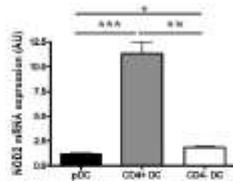


FIGURE 4 NOD2 expression in splenic DC subsets. NOD2 mRNA levels measured in freshly isolated splenic DC subsets from SPD rats by quantitative RT-PCR as described in *Materials and Methods*. Results expressed as the mean \pm SD of three independent experiments are shown. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

In vitro survival and maturation of splenic DC subsets in response to TLR and NOD2 ligands

We next analyzed whether the pattern of TLR and NOD2 mRNA expression observed in the different DC subsets correlated with a specific responsiveness to well-defined TLR and NOD2 ligands. We first assessed the effects of these ligands on *in vitro* DC survival and maturation. pDC and CD4⁺ DC exhibited an extremely poor spontaneous survival of <10% upon culture in medium alone, contrasting with the 30% spontaneous survival rate of CD4⁻ DC (Fig. 5). pDC survival was greatly enhanced by LPS

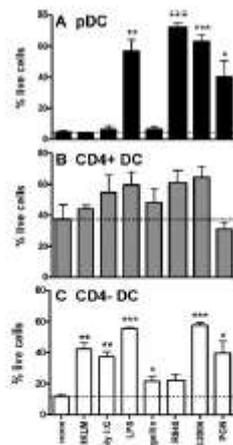


FIGURE 5 *In vitro* survival of splenic DC subsets. A total of 2×10^4 FACS-sorted DC from SPD rats was cultured in triplicate for 24 h in 200 μ l of culture medium in the absence or presence of different TLR ligands (HKL.M, poly(I:C), LPS, flagellin, RS48, or CpG2006) or PGN. Live cells were counted by FACS after exclusion of dead cells with Topo-3. Similar results were obtained in three independent experiments and with DC from the Lewis strain. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$, as compared with cells cultured in medium alone (none).

(TLR4), RS48 (TLR7/8), CpG2006 (TLR9), and PGN (NOD2) and was not affected by HKLM (TLR 2/6), poly(I:C) (TLR3), or flagellin (TLR5). CD4⁺ DC survival was strongly enhanced by ligands of TLR 2/6, 3, 4, and 9 and NOD2, enhanced only modestly by TLR5 ligands, and unaffected by TLR7/8 ligands. The survival of CD4⁻ DC was slightly increased by triggering of all TLR tested but was not significantly influenced by PGN. The data described in Fig. 5 were obtained with SPD DC, but Lewis DC exhibited very similar responses (data not shown).

The levels of expression of CD80, CD86, and MHC II were assessed on stimulated SPD DC after gating on live cells (Fig. 6). Again, similar responses were observed with Lewis DC. Fresh pDC expressed low levels of CD86 but not CD80, whereas CD4⁺ and CD4⁻ DC expressed no CD86 but low CD80. CD4⁺ DC matured "spontaneously" upon overnight culture. Correlating with their extremely poor survival in the absence of surviving signals, pDC and CD4⁺ DC did not significantly up-regulate CD80 or CD86 upon overnight culture. However, strong up-regulation of CD80 and CD86 on pDC was observed upon TLR7/8 and 9 triggering but not by other TLR or PGN. Regarding CD4⁻ DC, the CD80 levels were not significantly increased by any of the stimuli tested, as compared with cells cultured in medium alone, whereas CD86 expression was slightly increased by LPS, flagellin, and CpG2006. Finally, a strong up-regulation of both CD80 and CD86 was observed on CD4⁻ DC upon TLR3, 4, 7/8, and 9 and NOD2 triggering. Taken together, these data indicate a close correlation between the survival and maturation induced by TLR ligands and PGN in CD4⁻ DC. In contrast, LPS and PGN increased survival of pDC but did not induce maturation.

To correlate the maturation status of DC induced by TLR triggering with their APC function, we analyzed their capacity to induce proliferation of allogeneic CD4⁺ T cells (Fig. 7). In this experiment, DC were stimulated for 24 h, harvested, washed extensively, and living DC were enumerated before being mixed with T cells at a ratio of one DC for five T cells. Correlating with their capacity to spontaneously mature upon overnight culture, CD4⁺ DC induced substantial proliferation of CD4⁺ T cells, whereas pDC and CD4⁻ DC did not. The stimulatory capacity of pDC was

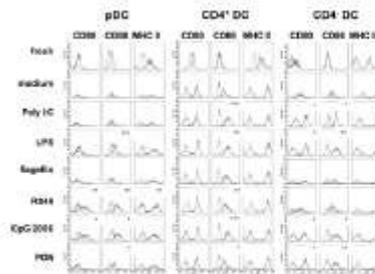


FIGURE 6 *In vitro* maturation of splenic DC subsets. The expression of CD80, CD86, and MHC II was analyzed by FACS on freshly sorted cells from SPD DC cultured for 24 h in the absence or presence of different TLR ligands (HKL.M, poly(I:C), LPS, flagellin, RS48, or CpG2006) or PGN. Similar results were obtained in three independent experiments and with DC from the Lewis strain. Statistical analysis was performed on mean fluorescence intensity. Asterisks indicate statistical significance (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

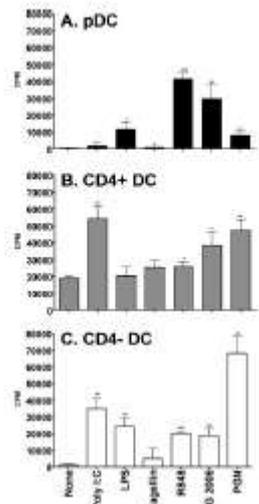


FIGURE 7. Allogeneic CD4⁺ T cell proliferation in response to TLR-stimulated splenic DC subsets. Allogeneic (SIR) CD4⁺ T cells (2×10^5) were cultured for 4 days with 4×10^5 TLR-stimulated pDC (A), CD4⁺ DC (B), or CD4⁻ DC in round-bottom 96-well plates in the presence of PHA-IB for the last 5 h. Proliferation was assessed, and results are expressed as the mean counts per minute \pm SD of between three and four experiments according to the type of stimulation. Asterisks indicate statistical significance as compared with cells cultured in medium alone (none), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

strongly enhanced TLR7/8 and 9 triggering, more modestly enhanced by TLR4 and NOD2, and was unaffected by TLR3 and 5 stimulation. The strongest activator of CD4⁺ DC APC function was NOD2, followed by TLR3 and then TLR4, 7/8, and 9, whereas TLR5 triggering had only marginal effects. The APC capacity of CD4⁺ DC was enhanced by TLR3 and 9 and NOD2 stimulation but not significantly by other TLR ligation.

Cytokine production by splenic DC subsets in response to TLR ligation

The production of IL-12p40, IL-10, TNF- α , IL-6, and type I IFN was assessed in the supernatant of TLR-stimulated SPD DC (Fig. 8). In agreement with our previous study (25), we found that CD4⁺ DC produced much higher IL-12p40 than CD4⁻ DC (10- to 20-fold higher). Very low levels of IL-12p40 were sometimes detected in the supernatants of CD4⁻ DC cultured in medium alone, indicating some degree of activation likely due to the DC purification procedure. TLR9 triggering was the strongest IL-12p40 inducer in CD4⁺ DC, followed by NOD2 and TLR4. TLR3 and 5 stimulations were poor IL-12p40 inducers, whereas TLR7/8 ligands had a reproducible effect. CD4⁺ DC were found to produce very low amounts of IL-12p40 upon stimulation of TLR2/6, 7/8, and 9. But pDC produced large amounts of IL-12p40 upon ligation

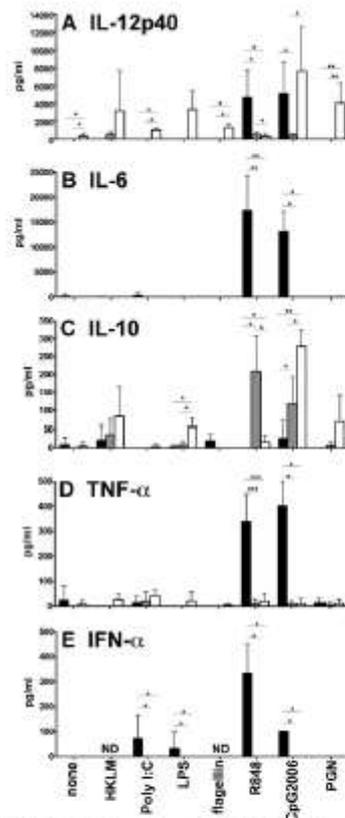


FIGURE 8. Cytokine production by splenic DC. Splenic DC subsets from SPD rats were sorted by FACS and cultured for 24 h (1×10^6 /ml) in the absence or presence of different TLR ligands (HKLM, polyI:C, LPS, flagellin, B848, or CpG2006) or IGN. The amounts of IL-12p40 (A), IL-10 (B), IL-6 (C), and TNF- α (D) were measured by ELISA. Supernatants were collected, and the amounts of type I IFN were assayed by a bioassay (E). Results are expressed as the mean \pm SD of three experiments. Very similar results were obtained with DC from Lewis rats. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

of TLR 7/8 and 9 exclusively. In our hands, the bioactive form of IL-12 (IL-12p70) was detected only in very low amounts (<100 pg/ml) and reproducibly in the supernatant of TLR9- but not TLR7/8-stimulated CD4⁺ DC and of TLR7/8- but not TLR9-stimulated pDC (Fig. 9).

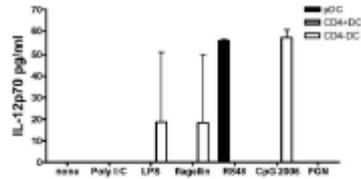


FIGURE 9. IL-12p70 production by splenic DC. Splenic DC from SPD rats were stimulated as described in Fig. 8, and the amounts of IL-12p70 in the supernatants were measured by ELISA. Results are expressed as the mean \pm SD of three experiments.

pDC produced very large amounts of IL-6 when stimulated through TLR7/8 (~ 10 ng/10⁶ cells/ml), as well as TLR9 (~ 6 ng/ml). In contrast, CD4⁺ and CD4⁻ DC produced extremely low, if any, IL-6 using the same stimulation conditions. pDC were also the main producers of TNF- α (10- to 20-fold higher than OX62⁺ DC) upon TLR7/8 and 9 stimulation. In contrast, pDC produced very low, if any, IL-10 (< 25 ng/ml). CD4⁺ DC produced moderate levels of IL-10 upon TLR9 stimulation and low levels upon TLR4 stimulation. Contrasting with their extremely poor production of proinflammatory cytokines as compared with other DC subsets, CD4⁺ DC were found to produce moderate but quite variable amounts of IL-10 upon TLR7/8 and 9 stimulation. In agreement with our previous report (24), we confirm in this study that pDC were the only cells to produce type 1 IFN, as determined by an *in vitro* bioassay, with R848 being the strongest inducer. In contrast to CpG type A CpG2216 that induced very high amounts of type 1 IFN (24), the type B CpG 2006 was a poor inducer.

On a cell basis, there was no strain-dependent differences in the amounts of IL-12p40, IL-6, and TNF- α produced by the different DC subsets in response to TLR7/8 and 9 (data not shown). We also assessed whether CD40 triggering could synergize with TLR stimulation in inducing IL-12p40 production in DC subsets. No synergistic effect was observed for pDC, whereas a moderate synergistic effect between CD40L and NOD2 of TLR9, and between CD40L and TLR7/8 or 9 triggering, was observed in the induction of IL-12p40 by CD4⁺ and CD4⁻ DC, respectively (data not shown). Finally and in agreement with our previous study (25), we could not significantly or reproducibly detect IFN- γ in the supernatant of any stimulated rat DC subset (data not shown).

Expression of TLR signaling molecules in splenic DC subsets

According to our results, despite expressing the broadest repertoire of PRR among DC subsets, CD4⁺ DC exhibited poor responsiveness to all the PRR ligands tested in this study, at least *in vitro*. Because this could be related to differential intracellular TLR signaling, we analyzed the expression of MyD88, TRAF6, and IRAK4 mRNA in DC subsets (Fig. 10). In the three strains analyzed (SPD, Lewis, BN), MyD88 and TRAF6 mRNA were strongly expressed in DC, with pDC expressing significantly higher levels than OX62⁺ DC, and the CD4⁺ and CD4⁻ subsets expressing similar levels. IRAK4 mRNA was expressed at very low levels in pDC and was undetectable in OX62⁺ DC.

Discussion

In this study, we have assessed the PRR repertoire of three DC subsets that we and others have characterized in the rat spleen, namely CD4⁻ DC, CD4⁺ DC, and pDC. These three DC subsets

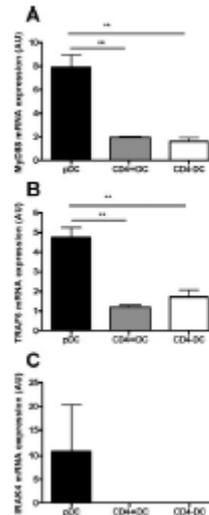


FIGURE 10. MyD88 (A), TRAF6 (B), and IRAK4 (C) expression in splenic DC subsets. MyD88, TRAF6, and IRAK4 mRNA levels were measured in freshly isolated splenic DC subsets from SPD rats by quantitative RT-PCR as described in Materials and Methods. Results expressed as the mean \pm SD of three independent experiments are shown. Similar profiles were observed in DC from Lewis or BN rats. **, $p < 0.01$.

exhibited specific surface phenotypes and morphologies. These differences extend to the capacity of each subset to respond to specific PRR ligands and to the type of response. Whereas DC subset frequencies were strongly strain dependent, the profile of TLR expression and responsiveness in the different subsets was conserved between strains. CD4⁺ DC and pDC exhibited quite opposite repertoires that correlated with their *in vitro* responsiveness to various PRR ligands. However, the plasticity of the response was very limited. In contrast, CD4⁻ DC displayed the broadest repertoire of PRR, including high levels of NOD2, but very limited responsiveness to PRR ligands and were extremely poor producers of cytokines in general.

In agreement with a recent study performed in the mouse by Asselin-Paturel et al. (30), we found that the frequency of pDC in the spleen was strongly strain dependent. This was also true for the other DC subsets, although to a lesser extent. Thus, Lewis rats have 3- to 4-fold more pDC than the other strains tested, and BN rats have the highest numbers of CD4⁺ DC. The fact that DC subsets could influence Th1 or Th2 responses (5) makes the difference between the Lewis and BN strains especially relevant. Indeed, Lewis rats are known to be prone to several Th1-mediated autoimmune diseases while being resistant to those mediated by Th2, whereas BN rats behave oppositely (31). Moreover, we showed that CD4⁺ DC were the only DC subset to promote IL-13-producing CD4⁺ T cells (25) and that mature pDC drive Th1 differentiation (24). Whether the difference in DC subset numbers

between strains is genetically determined or rather T cell dependent remains to be investigated. A study by Liu et al. (32) suggested differences in TLR expression between BALB/c and C57BL/6 DC. Although the levels of TLR and NOD2 mRNA expression also differed between rat strains (data not shown), the profile of each DC subset was similar in all strains. The fact that we detected all TLR mRNA in all DC is due to the high sensitivity of our PCR technique. We confirmed that rat pDC have a restricted TLR repertoire with high levels of TLR7 and 9 (24), a pattern that is conserved in human (9), as well as murine pDC (17, 33). The expression of other TLR in murine pDC is not as clear, probably because of different sensitivities in the PCR method used and different purity and tissue origin of the pDC studied. In a previous study, we found pDC to additionally express low levels of TLR1 and 6 mRNA rather than TLR2 as found in the present study. This is likely due to a technical change (TaqMan probes in this study vs SYBR Green in our previous study). TLR4 was not found in human pDC, whereas its expression in mouse was detected in thymic (33) but not in spleen pDC (17). We found very low levels of TLR4 mRNA in rat spleen pDC, which correlated with a partial response to LPS *in vitro* (survival). Another difference between human and rodent DC concerns TLR9, which is restricted to pDC in human blood, but which is expressed in all spleen DC subsets in mice (16, 17) and in rats, as shown in this study. However, it is difficult to draw conclusions before TLR9 expression in lymphoid organ-derived DC has been assessed in humans. In fact, a recent study has shown strong TLR9 gene expression in BDCA3⁺ interstitial DC (34). Like human CD11c⁺ DC, OX62⁺ rat DC expressed a much broader TLR repertoire than pDC. The main feature of CD4⁺ DC, as compared with other subsets, was a high expression of TLR3 and 10, a very low expression of TLR7 and a barely detectable TLR8. Finally, CD4⁺ DC expressed all TLR together with high levels of NOD2.

The repertoire of PRR expressed by CD4⁺ and pDC correlated with their responsiveness to specific ligands and that these two subsets responded in quite a stereotyped fashion. pDC responded specifically to TLR7/8 and TLR9 stimulation by surviving, maturing, and producing high amounts of IL-12p40, IL-6, and TNF- α but not IL-10, whereas CD4⁺ DC responded to TLR2/6, 3, 4, 5, and 9 by surviving, maturing, and producing high IL-12p40, low IL-10, very low TNF- α , and no IL-6. Both pDC and CD4⁺ DC produced, however, very low amounts of the bioactive IL-12p70, suggesting that, at least in these *in vitro* stimulation conditions, the p40 chain was produced in very large excess. Whether an additional signal such as IFN- γ or IL-4 priming (35) might be necessary for optimal IL-12p70 production in rat DC is currently under investigation. We previously demonstrated that the stimulation of pDC, but not other DC subsets, with influenza virus induced an alternate response characterized by high type I IFN but very low IL-12, IL-6, and TNF- α production and poor survival (24). In this previous study, we also found pDC to be poor producers of TNF- α . In fact, we were using the murine-specific CpG ODN 1668 instead of the human CpG ODN 2006 that is more efficient for inducing TNF- α , as well as IL-12 in rat DC, and, moreover, the effect of B848 was not assessed in our first study of rat pDC. pDC were actually the strongest producers of not only TNF- α but also IL-6 that was secreted in extremely high amounts. The fact that the production of IL-6 was restricted to pDC in the rat is surprising because this is not the case in humans (9) or in mice (36). A recent study indicated that pDC-produced IL-6 played a role in B cell differentiation and Ig production (37). Production of IL-6 by conventional DC in response to TLR ligands during infection could in addition be critical for T cell activation by allowing pathogen-

specific T cells to overcome the suppressive effect of CD4⁺ CD25⁺ T cells (38).

In contrast to other DC subsets and despite being equipped with the broadest repertoire of PRR, at least at the mRNA level, CD4⁺ DC exhibited poor responsiveness to TLR and NOD2 ligands. The expression of costimulatory molecules on CD4⁺ DC was only marginally affected by TLR ligands, suggesting that the effect of mechanical or chemical stresses induced during the purification procedure was dominant over TLR signaling. Their cytokine profile was characterized by low IL-12p40 and moderate IL-10 production in response to TLR2/5, 7/8, and 9. It is possible that their full activation requires synergistic signals from different TLR (39, 40). CD4⁺ DC were found to stimulate CD4⁺ and CD8⁺ T cells very efficiently and were shown to induce Th1 cells *in vitro*, probably using an IL-12 independent pathway, together with low numbers of IFN- γ /IL-13-producing Th cells (25). In the steady-state spleen, these DC that coexpress high levels of CD4 and SIRP- α molecules were found to form a ring around the T cell area (41). Upon i.v. LPS injection, CD172a⁺ DC relocated to the T cell area and exhibited an increase in costimulatory molecule expression. Whether the effect of LPS on CD4⁺ CD172a⁺ rat DC *in vivo* is direct or not is unknown. Interestingly, subsets of CD4⁺ CD172a⁺ and CD4⁺ CD172a⁺ DC were also identified in afferent lymph and mesenteric lymph nodes by others (21). It is tempting to speculate that these subsets are related to the spleen CD4⁺ and CD4⁺ DC we described here, however, although splenic DC are blood-derived cells, and DC circulating in lymph are tissue derived. Recent reports suggest the unifying hypothesis that most if not all lymphoid organ DC are monocyte-derived (42, 43). In addition, a recent report has shown, in the rat, that a CD43⁺ subset of circulating monocyte could differentiate in intestinal lymph CD4⁺ CD172a⁺ and CD4⁺ CD172a⁺ DC in the absence of inflammatory stimuli (44).

Although rat DC do not express CD8, as do mice DC, the recent description of a CD4⁺ subset of DC in mice (45) makes the comparison between mouse and rat DC much easier. CD4⁺ rat DC resemble mouse CD4⁺ CD8⁺ DC, both are found in the marginal zone, express all TLR, are poor producers of inflammatory cytokines, but are potent stimulators of allogeneic T cells. Rat CD4⁺ DC share many common features with mouse CD4⁺ CD8⁺ DC; both are found in T cell areas and red pulp, express high TLR3 and very low (rat) or no (mouse) TLR7 (16), are the main producers of IL-12, potent stimulators of CD4⁺ but not CD8⁺ T cells (25, 46), and are Th1 inducers (18, 25). Recently, we showed that, unlike CD4⁺ or pDC, CD4⁺ DC are very efficient at phagocytosing apoptotic cells (26), a property shared by CD4⁺ CD8⁺ DC in the mouse (47). Both rat CD4⁺ (48, 49) and mouse CD8⁺ (50) DC subsets have been suggested to play a role in self-tolerance. However, their potent phagocytic activity, their rather large TLR repertoire, and their capacity to produce high IL-12 also suggest a role in immune responses to intracellular pathogens.

To conclude, together with recent data obtained in humans and in mice (45), our results suggest that the specialization in pathogen recognition capacity and immune functions of DC subsets is relatively conserved between species. Our results indicate that the differential expression of PRR in DC subsets is not limited to TLR but is also true for NOD2. Finally, the rather stereotyped response of each splenic DC subset suggests that their intrinsic plasticity is limited.

Acknowledgments

We thank Paul Piet for expert electronic microscopy.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

- Janeway, C. A., Jr., and E. Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20: 197–216.
- Akira, S., K. Takeda, and T. Kohno. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2: 675–680.
- Bancheton, J., and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 393: 245–252.
- Schnee, M., G. M. Pastan, A. C. Holl, E. Takeda, S. Akira, and E. Medzhitov. 2004. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5: 947–950.
- Palmiter, R. 2004. Modulating Th1/Th2 responses with microbes, dendritic cells, and pathogen recognition receptors. *Immunity* 20: 187–196.
- Bancheton, J., P. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecqz, Y. J. Liu, R. Palmiter, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18: 767–811.
- Palmiter, R. 2004. Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors. *Immunity* 19: 227–230.
- Rizova, M. C., V. Sosneko, N. Kalowicki, G. Gronow, P. Briere, R. de Waal Malefyt, and Y. J. Liu. 1999. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 285: 1163–1166.
- Kalowicki, N., S. Ho, S. Antonenko, R. W. Malefyt, R. A. Kastelein, P. Briere, and Y. J. Liu. 2001. Subsets of human dendritic cell precursors express different Toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 194: 863–869.
- Ro, T., R. Amakawa, T. Kato, H. Hiram, K. Tajima, K. Yokota, Y. Ozaki, H. Tomizawa, S. Akira, and S. Palucka. 2002. Interferon- α and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J Exp Med* 195: 1507–1512.
- Kalish, P. C., M. H. Khan, B. A. Wherry, and M. L. Kagan. 1998. T cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 19: 561–567.
- Kalowicki, N., S. Antonenko, J. Y. Liu, and Y. J. Liu. 2000. Natural interferon α/β -producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 192: 216–226.
- Vonacek, D., J. Probst, H. Hecht, L. Wu, and K. Shortman. 2000. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subsets in mouse thymus and spleen. *J Immunol* 164: 2978–2986.
- Araujo-Perez, C., A. Boccia, M. D'Alò, I. Durand, N. Yonad, C. Duronio-Davila, A. Vicari, A. O'Garra, C. Bress, F. Rizzo, and G. Trinchieri. 2001. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol* 2: 1114–1120.
- Reis e Sousa, C., S. D'Elia, A. D. Edwards, N. Rogers, D. Schulz, and R. Sparo. 2003. Regulation of dendritic cell function by microbial stimuli. *Pathol Biol* 51: 67–78.
- Edwards, A. D., S. S. Diebold, E. M. C. Slack, H. Tostanova, H. Hammad, T. Kohno, S. Akira, and C. Reis e Sousa. 2003. Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8⁺ DC correlates with responsiveness to intracytoplasmic. *Eur J Immunol* 33: 827–833.
- Nak, S. H., A. I. Probst, N. S. Wilson, A. D'Alò, P. Schreiber, M. Pechinger, M. H. Lahoud, M. O'Keefe, Q. X. Sun, W. F. Chen, et al. 2005. Cloning, oligo-generation of splenic CD8⁺ and CD8⁺ dendritic cell equivalents in Pdc-like myeloid lineage 5 ligand bone marrow cultures. *J Immunol* 174: 6902–6907.
- Muller-Lissner, R., T. De Smedt, P. Michel, J. Godfried, B. Pajak, C. Huttmann, K. Thielmann, O. Leo, J. Urbani, and M. Messer. 1999. CD8⁺ and CD8⁺ subsets of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med* 190: 987–992.
- Palmiter, R., J. L. Smith, G. Caspar, K. Rasmussen, D. Pettit, E. Musakovskiy, and C. R. Maliszewski. 1999. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1035–1041.
- Liu, Y. J. 2005. IPC: professional type I interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 23: 275–306.
- Liu, L., M. Zhang, C. Ankin, and G. G. MacPherson. 1998. Dendritic cell heterogeneity in vivo: two functionally distinct dendritic cell populations in rat intestinal lymph can be distinguished by CD4 expression. *J Immunol* 161: 1146–1155.
- Trinkle, B., C. Votava, H. Yagita, and R. Josien. 2003. A subset of cytolytic dendritic cells in rat. *J Immunol* 170: 4202–4208.
- Tanzil, E., and G. MacPherson. 2004. Immunobiology of dendritic cells in the rat. *Immunol Rev* 194: 58–68.
- Hahnel, F. X., C. Votava, C. Lorenz, M. Heule, and R. Josien. 2004. Rat plasmacytoid dendritic cells are an abundant subset of MHC class II⁺CD4⁺CD11b⁺CD83⁺ and type I IFN-producing cells that exhibit selective expression of Toll-like receptors 7 and 9 and strong responsiveness to CpG. *J Immunol* 172: 3485–3494.
- Votava, C., P. X. Hahnel, B. Trinkle, M. Heule, and R. Josien. 2002. Two phenotypically distinct subsets of splenic dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell-stimulatory activity. *J Immunol* 169: 2284–2291.
- Tanabe, H., C. Charvát, H. Pech, C. Votava, M. Heule, and R. Josien. 2005. Immature CD4⁺CD103⁺ rat dendritic cells induce rapid caspase-independent apoptosis-like cell death in various tumor and metastatic cells and phagocytose their victims. *J Immunol* 175: 2408–2417.
- Galloum, C., C. Lorenz, E. Román, J. M. Heule, M. Heule, L. Tenon, C. Vignon, C. Gifflet, Y. Chet, L. A. Turka, et al. 2004. The role of TLR-related activation-induced cytolysis receptor activating NF- κ B interaction in acute allograft rejection and CD40L-independent chronic allograft rejection. *J Immunol* 172: 1639–1648.
- Granda, S. E., I. G. Roman, J. Viola, M. Charanfarid, A. Labigne, G. Thomas, D. J. Philpot, and P. J. Sansonetti. 2003. Sica2 is a general sensor of peptidoglycan through mannose 6-phosphate (M6P) detection. *J Biol Chem* 278: 4859–4872.
- Taniguchi, I., H. S. E. Granda, D. J. Philpot, M. A. Nohari, C. Wirth, and I. G. Roman. 2004. Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *IMB Rep* 3: 1003–1006.
- Amadio-Patard, C., G. Brizard, J. J. Ra, F. Rizzo, and G. Trinchieri. 2003. Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody. *J Immunol* 171: 6466–6473.
- Poulsen, G. J., B. Cantata, E. Nyström, J. Duranton, M. Mox, D. Lagrange, I. Bernard, J. F. Saba, L. Pellerin, F. Durat, and A. Sæviak. 2001. Cellular and genetic factors involved in the difference between Brown Norway and Lewis rats to develop respectively type 2 and type 1 immune-mediated diabetes. *Immunity* 14: 145–160.
- Liu, T., T. Matsumachi, N. Tanabe, T. Yajima, and Y. Yoshida. 2002. Differences in expression of Toll-like receptors and their reactivities in dendritic cells in BALB/c and C57BL/6 mice. *Immunol Lett* 70: 6635–6645.
- Okada, T., Z. X. Liu, M. Nishi, A. A. Amari, S. Hatanaka, and M. H. Gumbria. 2003. Murine thymic plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 33: 1042–1048.
- Lizhok, M., K. Lundberg, and C. A. Berntson. 2005. Gene family clustering identifies functionally associated subsets of human in vivo blood and tonsillar dendritic cells. *J Immunol* 175: 4839–4846.
- Trinchieri, G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3: 135–146.
- Sato, A., M. Hoshiguchi, E. Toda, A. Iwasaki, S. Hachisuga, and S. Kamagawa. 2003. CD11b⁺ Peyer's patch dendritic cells secrete IL-6 and induce I κ B α secretion from naive B cells. *J Immunol* 171: 3684–3690.
- Ago, G., A. K. Palucka, J. P. Blaszczak, C. Chalotat, V. Pincus, and J. Bancheton. 2003. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin-6. *Immunity* 19: 225–234.
- Pature, C., and E. Medzhitov. 2003. Toll pathway-dependent blockade of CD4⁺CD25⁺ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 299: 1035–1036.
- Gantier, G., M. Hantson, F. Desvergne, M. Scallier, J. Hiscit, B. H. Rizo, G. Trinchieri, C. Caux, and P. Garros. 2005. A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *J Exp Med* 201: 1435–1446.
- Napoli, G., A. Rivetti, P. Ferroni, P. Salinas, and A. Lanzavecchia. 2005. Selected Toll-like receptor agonist combination synergistically triggers a Th1polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol* 6: 765–770.
- Tanzil, E. L., U. Yeh, C. D. Jenkins, and G. G. MacPherson. 2005. Intestinal dendritic cell subsets: differential effects of systemic TLR4 stimulation on regulatory fate and activation in vivo. *J Immunol* 174: 1374–1384.
- Geissmann, F., S. Jung, and D. E. Littman. 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19: 71–82.
- Leon, B., G. Martinez del Hoyo, V. Parfili, H. H. Vargas, P. Sanchez-Mateos, N. Longo, M. Lopez-Hueto, and C. Ardavin. 2004. Dendritic cell differentiation potential of mouse monocytes: monocytes represent immature precursors of CD8⁺ and CD8⁺ splenic dendritic cells. *Blood* 103: 2668–2676.
- Yeh, U., C. D. Jenkins, and G. G. MacPherson. 2006. Relationships between distinct blood monocyte subsets and migrating intestinal lymph dendritic cells in vivo under steady-state conditions. *J Immunol* 176: 4155–4162.
- Shostakov, K., and Y. J. Liu. 2002. Murine and human dendritic cell subsets. *Nat Rev Immunol* 2: 151–161.
- Kronin, V., K. Winkler, G. Sun, A. Kralj, W. Heath, J. Kirberg, H. von Boehmer, and K. Shortman. 1995. A subset of dendritic cells regulates the response of naive CD8⁺ T cells by limiting their IL-2 production. *J Immunol* 157: 3810–3827.
- Dyda, T., S. Shinoyama, K. Liu, Y. Onatani, Y. Akhanna, Y. Murakami, K. Takahara, R. M. Steinman, and K. Inaba. 2002. The CD8⁺ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J Exp Med* 194: 1289–1302.
- Sheng, F. P., N. Patti, M. Wykes, J. E. Major, T. J. Probst, C. D. Jenkins, and G. G. MacPherson. 2003. A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J Exp Med* 191: 435–444.
- Steinman, R. M., S. Turley, I. Mellman, and K. Inaba. 2003. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 191: 411–416.
- Heath, W. R., and P. E. Carboni. 2004. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 19: 47–64.

II. Article 2

Les cellules dendritiques conventionnelles versus plasmacytoides contrôlent différemment l'activité suppressive et la prolifération des cellules T régulatrices

Par : **Asmahan Ouabed**, François-Xavier Hubert, Dominique
Chabannes, Michèle Heslan, et Régis Josien

Article Soumis pour publication

II.1 Résumé de l'article 2

L'anergie et la suppression sont des caractéristiques fondamentales des cellules TCD4⁺ CD25⁺ FOXP-3⁺ (Treg) qui sont contrôlées par l'état de maturation des cellules dendritiques (DC). Cependant, les capacités des populations de DC des organes lymphoïdes à contrôler les Treg restent inconnues. Ici, nous avons analysé, chez le rat, le rôle des DC spléniques conventionnelles CD4⁺ et CD4⁻, et des DC plasmacytoides (pDC) dans la prolifération et la suppression des Treg allogéniques in vitro. Comme attendu, en absence d'IL-2 exogène, les Treg ne prolifèrent pas en réponse aux DC immatures. Après maturation via les TLR, toutes les DC peuvent devenir de puissantes stimulatrices des cellules TCD4⁺ CD25⁻, tandis que seules les pDC matures stimulées via TLR 7 ou 9 induisent en absence d'IL-2 exogène une forte prolifération des cellules TCD4⁺ CD25⁺ FOXP-3⁺. Cette capacité des pDC à induire la prolifération des Treg est indépendante de l'IL-2, nécessite un contact cellulaire et est partiellement dépendante de CD86. Dans des tests de suppression, les Treg suppriment fortement la prolifération et la production d'IL-2 et d'IFN- γ produits par les cellules T effectrices induites par les DC CD4⁺ et CD4⁻ matures. En présence de pDC matures, les cellules Treg suppriment la production d'IL-2 mais pas la prolifération ni la production d'IFN- γ des cellules TCD25⁻. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'anergie et la fonction suppressive des Treg sont différenciellement contrôlées par les populations de DC.

Differential control of T regulatory cell proliferation and suppressive activity by mature plasmacytoid versus conventional dendritic cells ¹

Running title: Differential control of Treg by DC subsets

Asmahan Ouabed ^{*}, Francois-Xavier Hubert ^{2*}, Dominique Chabannes ^{*},
Michèle Heslan ^{*} and Régis Josien ^{3*‡}

^{*} INSERM, U643, Nantes, F44093 France; CHU Nantes, Institut de
Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITERT, Nantes, F44093
France; Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F44093 France

[‡] CHU Nantes, Laboratoire d'Immunologie, Nantes, F44903 France

Keyword: rodent, dendritic cells, T cells, tolerance/suppression/anergy

Corresponding author: Régis Josien, MD PhD
INSERM U643 - ITERT
30 boulevard Jean Monnet
44093 Nantes Cedex 1, France.
Tel : +33-240-087-413.
Fax : +33-240-087-411.
Email: Regis.Josien@univ-nantes.fr

SUMMARY

Anergy and suppression are cardinal features of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T cells (Treg) which have been shown to be tightly controlled by the maturation state of dendritic cells (DC). However, whether lymphoid organ DC subsets exhibit different capacities to control Treg is unclear. Here, we have analyzed, in the rat, the role of splenic CD4⁺ and CD4⁻ conventional DC and plasmacytoid DC (pDC) in allogeneic Treg proliferation and suppression in vitro. As expected, in the absence of exogenous IL-2, Treg did not expand in response to immature DC. Upon TLR-induced maturation, all DC became potent stimulators of CD4⁺CD25⁻ T cells whereas only TLR7 or 9-matured pDC induced strong proliferation of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T cells in the absence of exogenous IL-2. This capacity of pDC to reverse Treg anergy required cell contact, was partially CD86-dependent and IL-2-independent. In suppression assays, Treg strongly suppressed proliferation and IL-2 and IFN- γ production by CD4⁺CD25⁻ T cells induced by mature CD4⁺ and CD4⁻ DC. In contrast, upon stimulation by mature pDC, proliferating Treg suppressed IL-2 production by CD25⁻ cells but not their proliferation or IFN- γ production. Taken together, these results suggest that anergy and the suppressive function of Treg are differentially controlled by DC subsets.

INTRODUCTION

Naturally occurring CD4⁺CD25⁺FOX-P3⁺ T regulatory cells (hereafter referred to as Tregs)⁴ play a major role in the peripheral tolerance of T cells by controlling potentially deleterious self-reactive T cells that have escaped thymic clonal deletion (1). A role for Tregs in several auto-immune diseases has been demonstrated (2) and Tregs also appear to play an important role in various models of allograft tolerance (3). In humans, like in mice, Tregs are mainly present in the CD4⁺CD25^{high} T cell population that represents 5 to 10% of CD4⁺ T cells (1). The precise phenotype of these cells has been determined and differs from that of activated conventional T cells. Tregs express high levels of CD25 (4) and, in humans, they can express several additional surface markers such as CD62L, CTLA4, CD103, GITR or HLA-DR (1). Tregs are generated in the thymus and re-circulate through secondary lymphoid organs. Their development is tightly regulated by the expression of a specific transcription factor called forkhead box P3 (FOX-P3)⁴ that is also required for the suppressive function of Tregs. The induction of Treg activity requires TCR triggering and is therefore antigen-specific (1). However, once triggered, the suppressive activity of Tregs is not specific and can therefore target both antigen-specific and non-specific T cells (1). Although still controversial, the mechanism of action of Tregs appears to require cell contact (5), at least in vitro. Moreover, interleukin-2 appears to be critical for both the homeostasis (6) and the suppressor activity (7) of Treg, although a major feature of Treg is their capacity to suppress the production of IL-2 by effector T cells (8).

The homeostasis and mechanism of activation of Tregs in vivo remain poorly understood. In vitro, Tregs are known to be anergic or at least hypoproliferative

as compared to CD4⁺CD25⁻ T cells (1). However, recent studies have indicated that in vivo, Tregs (9) or a subset of Tregs (10) actively proliferate in lymph nodes and that, in vitro mature dendritic cells (DC)⁴ could reverse the anergic state of murine Treg although this required in many cases high concentration of exogenous IL-2. DC are the only cells able to stimulate naïve T cells and are therefore considered as the main antigen-presenting cells to T lymphocytes (11). A critical step in the life of DC is their maturation, which endows them with potent T cell stimulatory activity and is triggered by various signals such as TLR ligands or inflammatory cytokines (12). In contrast immature DC have been suggested to induce or maintain peripheral T cell tolerance and in fact, most DC found in secondary lymphoid organs exhibit an immature phenotype in the steady state (13). In addition, functionally different subsets of DC have been described in human blood and rodent lymphoid organs (14). For instance, three DC subsets can be defined in rat spleen: conventional OX62⁺CD11b⁺CD4⁻ DC (hereafter referred to as CD4⁺ DC) and CD4⁻ DC (hereafter referred to as CD4⁻ DC) (15), and plasmacytoid DC (pDC) which are OX62⁻CD11b⁻ CD4^{high}CD45R⁺ (16). Both subsets of conventional DC express a large repertoire of TLR but only CD4⁻ DC produced high levels of IL-12 (17), whereas pDC selectively express TLR 7 and 9 and produce large amounts of type I IFN as well as IL-12p40. In the steady state in vivo, the phenotype of pDC is immature and their role in T cell stimulation remains controversial (18). However, pDC can be recruited in inflamed lymph node and once mature, pDC can efficiently stimulate naïve T cells (16).

Thus, because T cell areas contain several DC subsets (14), an important question is whether in vivo expansion of Tregs is dependent on a specific DC

subset. (19). Moreover, the manner in which Treg homeostasis and functions are regulated by DC in vivo is mostly unknown. One hypothesis is that Treg functions are mainly regulated by DC maturation state inasmuch as Tregs are strongly suppressive when DC are immature, whereas DC maturation leads to a blockade of the suppressive effect of Tregs (20). However, conceptually it might be more important that Tregs can regulate when immunity has been triggered, i.e. when DC are mature, rather than during a resting state, i.e. when DC are immature. In addition, it is possible that Treg expansion and functions are also regulated by the DC subtype involved in T cell stimulation.

In this study, we have analyzed the capacity of rat spleen DC subsets to induce allogeneic Treg proliferation and suppressive function in vitro. We found that mature pDC, but not conventional DC, were able to reverse Treg anergy in an IL-2 independent manner. Furthermore, we show that whereas Treg strongly suppressed proliferation and IL-2 and IFN- γ production by CD4⁺CD25⁻ T in the presence of allogeneic conventional mature DC, they suppressed IL-2 production but not the proliferation or IFN- γ production by CD4⁺CD25⁻ T cells in the presence of mature pDC.

MATERIALS and METHODS

Animals

Sprague Dawley (SPD), Lewis and Brown Norway (BN) rats were obtained from the Centre d'Élevage Janvier (Le Genest Saint-Isles, France) and were used when 6-10 weeks old. The study was approved by our Institutional Review Board.

Reagents

Polyinosinic-polycytidylic acid (PolyI:C) and LPS were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO). The phosphodiester oligonucleotide containing the CpG motif (CpG ODN) 2006 was synthesized by Sigma-Genosys (Saint Quentin Fallavier, France). Loxoribine was purchased from Invivogen (Toulouse, France). The murine CD40-Ligand (CD40L)-human CD8 fusion molecule was kindly provided by Pr. Y. Choi (Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA). Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFDA SE, CFSE)⁴ and 7-hydroxy-9H(1,3-dichloro-9,9-dimethylacridin-2-one , succinimidyl ester (DDAO-SE)⁴ were purchased from Molecular Probes (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France).

Antibodies

The following mouse anti-rat monoclonal antibodies (mAbs)⁴ obtained from the European Collection of Cell Culture (Salisbury, U.K.) were used for cell depletion, cytofluorometric studies and cell sorting after coupling if necessary to FITC or AlexaFluor 647 (Molecular Probes – Invitrogen): OX35 (CD4), R7.3 (TCR $\alpha\beta$), OX42 (CD11b/c), 3.2.3 (NKR-P1A), OX62 (integrin E2 chain or CD103), and OX39 (CD25, IL-2R α -chain). HIS24-FITC and -PE (CD45R),

OX35-PE (CD4), OX8-PE (CD8 α) and OX6-APC.Cy7 (MHC II) were obtained from BD Pharmingen (San Diego, CA). Anti-rat FOXP3-APC mAb was purchased from EBiosciences (San Diego, CA). Rat IL-2-specific and blocking polyclonal goat IgG was purchased from R&D Systems (Lille, France). A blocking mouse anti-rat CD25 mAb (clone ART-18) was provided by Pr Y. Jacques (INSERM U601, Nantes, France).

Dendritic cells

Spleens were minced and digested in 2 mg/ml collagenase D (Roche Diagnostics, Meylan, France) in RPMI 1640/1% FCS for 15 min at 37°C. EDTA at 10 mM was added for the last 5 min and the cell suspension was then pipetted up and down several times and filtered. Cells were separated into high density cells (containing most of the pDC) and low density cells (containing most of the conventional OX62⁺ DC) using a 14.5% Nycodenz (Nycomed, Oslo, Norway) gradient centrifugation as previously described (15). Low density cells were stained with TCR α/β -FITC (clone R7.3), CD45R-FITC (clone HIS24), CD4-PE (clone OX35) and CD103-Alexa 647 (clone OX62) mAbs. OX62^{high} CD4⁻ and OX62^{low} CD4^{high} cells were then sorted on a FACS Aria® (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) after excluding FITC⁺ cells. Purity was routinely >97% and >98%, respectively, for CD4⁺ and CD4⁻ DC. pDC were isolated from high density spleen cells after removal of red blood cells. T and partial B cell depletion was first performed by incubating cells with anti-TCR α/β and γ/δ mAbs (clones R7.3 and V65, respectively), followed by a mixture of anti-mouse and anti-rat Ig-coated magnetic beads (Dynal, Oslo, Norway). Cells were then stained with TCR α/β -FITC (clone R7.3), CD45RA-FITC (clone OX33),

CD11b/c-FITC (clone OX42), CD45R-PE (clone HIS24) and CD4-AlexaFluor® 647 (clone OX35) mAbs and CD45R⁺CD4^{high} were sorted on a FACS Aria® after excluding FITC⁺ cells (see Fig. 2A). Purity was routinely greater than 97.5%.

T cells

Lymph node CD4⁺ T cells were obtained by negative selection of CD11b/c⁺, NKR-P1A⁺ and CD8⁺ cells using specific mAbs (clones OX42, 3.2.3 and OX8), followed by anti-mouse IgG-coated magnetic beads (Dyna). Purity was routinely ≥99%. Cells were then stained with CD8-PE and CD25-Alexa 647 mAb and sorted on a FACS Aria, after gating out CD8⁺ cells, in CD25⁻, CD25^{low} and/or CD25^{high} cells (see additional Fig. 1)

Dendritic cell stimulation

Sorted DC subsets were either used immature or stimulated for 24h at 5x10⁵/ml in the presence of polyI:C (50 µg/ml), LPS (0.5 µg/ml), CpG2006 (10 nM), Loxoribine (100 µg/ml) or soluble mCD40L-hCD8 fusion molecule (1/1000 supernatant dilution). Cells were recovered and washed three times in complete medium before use in MLR.

Mixed leukocyte reaction and suppression assays

DC were cultured with allogeneic CD4⁺ T cell subsets in round-bottom 96-well plates in a final volume of 200 µl of complete RPMI. After 4 days at 37°C in 5% CO₂, cultures were pulsed for the last 8h with 0.5 µCi of [³H]TdR (GE Healthcare, Orsay, France) per well. The cells were then harvested onto glass fiber filters and [³H]TdR incorporation was measured using standard scintillation procedures (Packard Institute, Meriden, CT). In transwell experiments, MLR were performed in flat-bottom, 96-well Transwell plates (Corning, Avon,

France). Wells were pulsed with 0.5 μ Ci of [3 H]TdR, and cells of the upper and lower compartments were then harvested onto glass fiber filters for measurement of [3 H]TdR incorporation (Packard Institute).

Flow cytometry

Proliferation assays: T cells were labeled with CFSE (5 μ M) or DDAO-SE (5 μ M) for 5 min. at RT and then washed twice with complete RPMI. Proliferation of T cells induced by allogeneic DC was assessed by the dilution of either CFSE (excitation 488nm; detection 530/30 nm) or DDAO-SE (excitation 633nm; detection 630/20 nm) on a LSR II cytometer (BD Bioscience), thus enabling proliferation of both CD4⁺CD25⁻ (DDAO-SE) and CD4⁺CD25^{high} (CFSE) to be assessed simultaneously. Before analysis, cells were stained with MHCII-APC-Cy7 mAb, the MHC II high cells (DC) were gated out and dead cells were excluded by DAPI. *FOX-P3 staining:* intracellular FOX-P3 expression was assessed by flow cytometry on resting CD4⁺ T cells or stimulated and CFSE-labeled T cells following the manufacturer's recommendations (E-Biosciences). *Cell enumeration:* the numbers of cells in the MLR wells were evaluated by flow cytometry using Cytocounts number-calibrated microbeads (Dako, Trappes, France).

Cytokine production

The production of IL-2 (R&D systems), IL-10 and IFN- γ (BD Biosciences) in the supernatants was assessed by ELISA.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the student's t test.

RESULTS

1. Mature plasmacytoid but not conventional rat DC subsets reverse in vitro anergy of CD4⁺CD25⁺FOX-P3⁺ T cells in the absence of exogenous IL-2

In the rat, 10% of lymph node CD4⁺ T cells expressed FOX-P3 (Fig. 1). CD4⁺ T cell subsets were separated by FACS into CD25⁻, CD25^{low} and CD25^{high} subsets and FOX-P3 expression was analyzed on sorted cells. More than 70 and 85% of CD25^{low} and CD25^{high} cells, respectively, expressed FOX-P3 whereas only a small subset (2.6%) of CD25⁻ cells expressed FOX-P3 (**Fig. 1**). We next sought to determine whether splenic DC subsets had differential ability to stimulate the proliferation of allogeneic CD25⁻ and CD4⁺CD25^{high} T cells in vitro. We have previously described three DC subsets in the rat spleen: OX62⁺ CD11b/c⁺ CD4⁻ DC (CD4⁻ DC), OX62⁺ CD11b/c⁺ CD4⁺ DC (CD4⁺ DC) which are both conventional DC and pDC (OX62⁻ CD11b/c⁻ CD4^{high}CD45R⁺) (15, 16). DC were sorted by FACS and used, either in their immature state (freshly isolated) or after maturation induced by various TLR ligands or CD40L, to stimulate allogeneic T cells (ratio of 1:5). As shown previously (15, 16), freshly isolated CD4⁺ DC but not CD4⁻ DC and pDC induced low-level proliferation of allogeneic CD4⁺CD25⁻ T cells (**Fig. 2A**). All of the immature DC subsets induced no or very low-level proliferation of CD4⁺CD25^{high} T cells (**Fig. 2B**). Following stimulation by TLR ligands, all DC could become strong stimulators of CD4⁺CD25⁻ T cells (Fig. 2A). The lack of stimulatory activity of polyI:C on pDC and Ixoribine on CD4⁻ (Fig.2A) correlates with the absence or very low expression of TLR3 and TLR7 by pDC and CD4⁻ DC, respectively (17). Unlike in human, rat pDC express low levels of TLR4 and exhibit in vitro response to LPS

(17). Interestingly, only pDC stimulated with either TLR7 or TLR 9 ligands (Loxoribine and CpG2006, respectively) were able to promote strong proliferation of CD4⁺CD25^{high} T cells (**Fig. 2B**). Of note, this proliferation occurred in the absence of exogenous IL-2. Mature bone marrow-derived rat DC were also very poor inducers of allogeneic Treg proliferation in the absence of exogenous IL-2 (data not shown).

In most of the following experiments we focused on TLR9-stimulated DC. Indeed, all DC subsets express TLR9 mRNA (17) and exhibit a response to CpG2006 in vitro as assessed for instance by the equivalent upregulation of CD86, CD80 or MHC II expression on stimulated DC (17). Moreover, all CpG2006-stimulated DC subsets induced strong proliferation of CD4⁺CD25⁻ allogeneic T cells (no statistical difference in the mean proliferation of > 10 exp.). We confirmed that CpG-stimulated pDC induced potent proliferation of CD4⁺CD25^{high} allogeneic T cells across all DC:T cell ratios tested (**Fig. 3A**), whereas CD4⁻ DC were always unable to promote proliferation of CD4⁺CD25^{high} T cells and CD4⁺ DC induced no or only modest proliferation, differences which held true from day 2 to day 5 of the MLR (**Fig. 3B**). A similar profile was actually also observed with CD4⁺CD25^{low} T cells (data not shown). To confirm that pDC-induced Treg proliferation was alloantigen-specific, we compared the proliferation of CD4⁺CD25^{high} T cells to syngeneic or allogeneic CpG-stimulated DC in either FCS or normal rat serum (NRS)-containing culture media (**Fig. 3C**). In both FCS and NRS, the proliferation of Treg induced by pDC was much stronger in allogeneic than syngeneic conditions.

An important issue that needed to be addressed was whether mature pDC induced proliferation of FOXP3 expressing Treg rather than contaminating

CD25⁺FOX-P3⁻ T cells that account for 10-13% of CD4⁺CD25^{high} T cells (Fig. 1). For this purpose, T cells were labeled with CFSE after sorting, stimulated with CpG-matured DC for 4 days and then stained for FOX-P3. As shown in **figure 4**, the three DC subsets induced similar levels of CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation. Importantly, we did not observe any significant differences in the percentage of FOX-P3⁺ cells in these conditions, indicating that allogeneic DC-mediated stimulation did not induce CD25⁻ T cells to express de novo FOX-P3. In our hands, after 4 days of culture in medium alone, FOX-P3 expression was no longer detected in the few surviving isolated CD4⁺CD25^{high} T cells (**Fig. 4**). However, 50-60% of these cells were found to express high levels of FOX-P3 after stimulation by mature pDC, of which more than 90% had divided, whereas CD4⁺ and CD4⁻ DC induced very little division of FOX-P3⁺ cells (**Fig. 4**). As shown later, counting of absolute numbers of divided and non divided T cells in MLR after stimulation by DC subsets correlated with the 3H-thymidine incorporation data regarding the capacity of pDC, but not conventional DC to expand CD4⁺CD25^{high} T cells.

We next assessed whether Treg anergy in response to allogeneic CD4⁺ and CD4⁻ DC could be overcome by exogenous IL-2. Controls performed with CD4⁺CD25⁻ T cells showed that, as expected, their proliferation was enhanced by exogenous IL-2, whatever the nature of the APC (**Fig. 5A**). Although exogenous IL-2 also led to CD4⁻ and CD4⁺ DC promoting Treg proliferation, at least 1,000 U/ml of IL-2 was required to induce the same level of Treg proliferation as observed with pDC in the absence of exogenous IL-2. Intriguingly, no significant effect of IL-2 on the proliferation of Treg induced by pDC was observed (**Fig. 5B**).

Therefore, in the absence of exogenous IL-2, mature pDC, but not conventional CD4⁻ and CD4⁺ DC, reversed the so-called anergic state of Treg in vitro. This function of pDC is probably dependent on the maturation state of pDC rather than on a specific effect of TLR9 stimulation, as similar activity was found after TLR7-induced maturation. Additional experiments showed that the stimulatory effect of pDC on Treg was dominant as Treg anergy was reversed by pDC even in the presence of allogeneic CD4⁺ or CD4⁻ DC (data not shown).

2. Mature pDC-induced Treg proliferation is contact and costimulation-dependent but IL-2 independent

To analyze the role of soluble vs. membrane bound molecules in the stimulatory activity of pDC on Treg, we performed experiments in which the different cell subsets were separated by a semi-permeable membrane (transwell). The results presented in **figure 6** indicate that the stimulatory activity of pDC on Treg is dependent on cell contact. In addition, the lack of proliferation of Treg when stimulated with CD4⁻ DC could not be overcome by soluble factors derived from an MLR between Treg and pDC (data not shown). Because mature but not immature pDC promoted Treg proliferation, we assessed whether CD80 and CD86 were involved. As shown in **figure 7.A**, mature pDC-induced Treg, as well as, CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation was inhibited to the same extent by CTLA4-Ig. Treg proliferation induced by pDC was mostly CD80-independent but partially CD86-dependent (**Fig. 7B and C**).

We next assessed the role of IL-2. Several groups have shown that Treg cell proliferation in vitro is dependent on IL-2 produced by contaminating FOXP3⁻ or CD4⁺CD25^{low} T cells. Upon stimulation by CpG-stimulated DC subsets, CD4⁺CD25⁻ T cells produced substantial amounts of IL-2, with a peak of

production at day 4 (**Fig. 3B**). In contrast, hardly any IL-2 was detectable in the supernatant of CD4⁺CD25^{high} T cells, even when stimulated by pDC and therefore undergoing proliferation (**Fig. 3B**). The proliferation of CD4⁺CD25^{high} T cells induced by allogeneic mature pDC was not inhibited by a neutralizing rat IL-2 polyclonal Ab, which strongly inhibited CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation in the same conditions (**Fig. 7D**). A similar inhibitory effect of IL-2 blockade was observed following CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation induced by CD4⁺ or CD4⁻ DC (data not shown). Additional experiments performed with the blocking rat CD25 ART18 mAb also suggested that pDC-induced Treg proliferation was mostly CD25-independent (data not shown). Taken together, these data indicate that mature pDC induce IL-2-independent Treg cell proliferation in vitro.

3. Differential effect of DC subsets on the suppressive activity of CD4⁺CD25⁺ T cells in vitro.

We then assessed whether the suppressive activity of Tregs on CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation was also differentially regulated by mature DC subsets in MLR. Upon stimulation by CpG-matured CD4⁺ or CD4⁻ DC, Treg did not proliferate and did suppress the proliferation of CD25⁻ cells in a dose-dependent fashion (**Fig. 8A**). Because both CD25⁻ and CD25^{high} CD4⁺ T cells proliferated in response to allogeneic mature pDC, the 3H incorporation assay could not be used to clearly determine the proliferation of either population (**Fig. 8A**). Therefore, we analyzed the proliferation of CD25⁻ and CD25^{high} CD4⁺ T cells by FACS by the mean of CFSE and DDAO-SE probes dilution, respectively, at day 4 (**Fig. 8D-F**). The absolute numbers of undivided and divided CD25⁻ and CD25^{high} live cells was determined simultaneously in each

tube using calibrated fluorescent beads. This experiment confirmed the 3H incorporation data obtained with CD4⁺ and CD4⁻ DC and showed that, in the presence of CpG-stimulated pDC, proliferating Treg poorly suppressed CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation (< 50% suppression at a 1:1 ratio).

The suppressive activity of Treg was also analyzed according to the level of cytokine production by CD4⁺CD25⁻ T cells. CD25⁻, but not CD4⁺CD25^{high} T cells produced substantial amounts of IL-2 (**Fig. 8B**) and IFN- γ (**Fig. 8C**) upon stimulation by allogeneic mature DC. Treg strongly suppressed IL-2 and IFN- γ production by CD25⁻ T cells when stimulated by allogeneic CD4⁺ or CD4⁻ DC. In contrast, when stimulated by pDC, Treg proliferated and strongly suppressed the production of IL-2 but not IFN- γ production by CD25⁻ T cells. The data depicted in figure 7 were obtained at day 4 of culture, which corresponded to the peak of IL-2 production. However, both the absence of IL-2 production by pDC-stimulated Treg and the suppression of IL-2 production by Treg was observed from day 2 to day 7 of culture (data not shown).

DISCUSSION

Both anergy and suppressive activity of Treg have been proposed to be tightly controlled by the maturation state of DC. However, multiple DC subsets endowed with a specialized phenotype, function and location have been described in lymphoid organs and tissues and whether these DC subsets differentially control Treg activity is mostly unknown. Here, we have addressed this issue in the rat and have shown that Treg anergy was reversed in vitro by mature allogeneic pDC but not conventional splenic DC, the effect of pDC on Treg being IL-2 independent. Moreover, the suppressive activity of Treg was strongly down-modulated when stimulated by mature pDC as compared to cDC. Previous studies have examined the APC requirement for Treg expansion in vitro. In humans, mature monocyte-derived DC could not reverse CD4⁺CD25⁺ T cell anergy in the absence of exogenous cytokines (21, 22). In contrast, mature but not immature murine bone marrow-derived DC (BMDC) expanded monoclonal or polyclonal CD4⁺CD25⁺ T cells in the absence of exogenous IL-2 (19, 23-25). Fewer studies have been published on the capacity of murine lymphoid organ DC subsets to stimulate Treg. In a study by Yamazaki et al., mature CD8⁺ and CD8⁻ spleen DC subsets induced very poor monoclonal Treg proliferation, as compared to BMDC (19). The same group further reported that splenic CD11c^{high} DC were unable to promote allogenic Treg expansion in the absence of exogenous IL-2 (26), confirming previous data by Brinster et al obtained with LPS or CpG-stimulated CD11c⁺ spleen DC (25). Fisson et al. reported that freshly isolated spleen CD8⁺ DC were more effective at inducing monoclonal CD4⁺CD25⁺ T cell proliferation than CD8⁻ DC and pDC (27), although this expansion required exogenous IL-2 and the function of DC

following maturation was not assessed. Nevertheless, these studies did not assess whether proliferating CD4⁺CD25⁺ T cells were actually FOXP3⁺, neither did they directly compare mature conventional DC subsets and pDC. In the rat, we found that mature CD4⁻ and CD4⁺ spleen OX62⁺ DC, which are likely the counterparts of conventional CD8⁺ and CD8⁻ murine DC (15, 17), respectively, did not reverse Treg anergy in MLR in the absence of exogenous IL-2. Splenic pDC, in contrast, promoted Treg expansion under the same conditions, a capacity that was dependent on a strong maturation signal provided through TLR7 or 9.

Mature pDC-induced Treg expansion required cell contact and was partially dependent on CD86, despite all DC tested expressing similar levels of this molecule. A similar CD86-dependency of Treg expansion was observed previously with murine BMDC (19). Interestingly, the effect of pDC we observed on Treg proliferation was dominant, i.e. it was not inhibited by the presence of conventional DC. These data are consistent with the hypothesis that the capacity of mature DC to promote Treg expansion is related to specific expression by pDC of costimulatory molecules. Two candidates are GITR-L and ICOSL that were found to be expressed by human pDC (28, 29). Interestingly, ICOSL was involved in the capacity of pDC to induce the differentiation of IL-10-producing regulatory T cells (28, 29). TGF- β was also found to play a role in Treg expansion in vivo (30-32), however, we could not detect any effect of TGF- β blockade on pDC-induced Treg proliferation (data not shown). Indoleamine 2, 3 deoxygenase (IDO) is known to be expressed in mature DC (33) and in a subset of pDC endowed with tolerogenic properties especially toward tumor (34). A recent study indicate that IDO-expressing pDC directly activates Treg in

vivo in tumor bearing mice (35). Although CpG-activated rat pDC indeed strongly upregulated IDO mRNA, blocking IDO activity during MLR did not modify the capacity of pDC to promote Treg expansion (data not shown). Further experiments are needed to determine the molecular mechanism by which mature pDC reverse Treg anergy in vitro.

Results obtained in mice suggest that the suppressive activity of Treg is mainly controlled by the maturation state of DC (20). Mature BMDC were shown to reverse the CD4⁺CD25⁺ T cell anergy without reversing their capacity to suppress IL-2 production by effector cells (25). We found that Treg can suppress effector cell proliferation and cytokine production induced by conventional DC matured by CpG or LPS (data not shown). In the presence of mature pDC, however, proliferating Treg still efficiently suppressed IL-2 production by effector cells but not their proliferation and IFN- γ production. These data suggest that mature pDC can induce IL-2-independent effector T cell proliferation and that Treg are unable to inhibit pDC-induced Th1 differentiation. The fact that exogenous IL-2 did not affect Treg expansion induced by pDC challenges the possibility that Treg consumed IL-2 rather than suppressed its production by effector T cells when stimulated by pDC. The mechanisms that control Treg-mediated suppression are not fully understood but TCR signals (36), costimulation (8), inflammatory cytokines such as IL-6 (20) and members of the TNF superfamily such as 4-1BB (37) or GITR (38) have been implicated and need to be addressed in our system. Importantly, both the intrinsic suppressive activity of Treg and the responsiveness of effector T cells to Treg suppression can be targets of these control mechanisms. TLR ligands also appear to modulate Treg anergy and function, independently of their action

on APC (39-42), however, it is unlikely that the effect we observed is related to a direct effect of CpG on Treg as DC were extensively washed before use and because the effects of DC subsets differed.

Several studies suggest that the suppressive effect of Treg on effector T cells might act through DC inhibition (43-45). In fact, adoptively transferred Treg interact preferentially with CD11c⁺ CD8⁻ DC in mice (46). Interestingly, Houot et al. recently showed in humans that TLR-activated CD11c⁺ DC, but not pDC, were actually sensitive to the inhibitory effect of Treg in vitro (47). Whether such a contrasting effect of Treg on conventional DC vs. pDC might explain our observation needs to be addressed.

A role for pDC in the induction of regulatory cells has been suggested. In vitro, human CD40L- and CpG-stimulated pDC induced the generation of IL-10-producing CD8⁺ (48) and CD4⁺ (29, 49) regulatory T cells, respectively (29). In these studies, the induction of a regulatory phenotype requires activation and maturation of pDC. In fact, DC can induce in the presence of TGF- β the in vitro differentiation of FOXP3⁺ CD4⁺ T reg from FOXP3⁻ precursors as soon as day 3 after stimulation (50). In our hands, the stimulation of CD4⁺CD25⁻ T cells with TLR9-stimulated pDC did not induce their differentiation into CD4⁺FOXP3⁺ regulatory cells. In addition, adoptive transfer of antigen-presenting CpG-matured pDC in mice did not induce tolerance but rather immunity (51). Bone marrow pDC were, however, reported to play an important role in facilitating allogeneic hematopoietic stem cell engraftment (52) and lung pDC prevented disease in a mouse asthma model, possibly through regulatory T cell generation (53). Recipient pDC might also play an important role in the induction of vascularized allograft tolerance (54).

Our results suggest a new function of pDC in which they could be recruited in inflammatory lymph nodes (55) and favor T cell activation by down-modulating the suppressive activity of Treg. At the same time, pDC could favor the clonal expansion of auto-antigen-specific Treg that could later control the T-cell mediated inflammatory response in tissue during the effector phase of the immune response.

Acknowledgments

We thank Dr. Benoît Salomon, Bernard Vanhove and Ignacio Aneon for critically reading the manuscript.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

REFERENCES

1. Sakaguchi, S. 2004. Naturally Arising CD4⁺ Regulatory T Cells for Immunologic Self-Tolerance and Negative Control of Immune Responses. *Annual Review of Immunology* 22:531-562.
2. Wraith, D. C., K. S. Nicolson, and N. T. Whitley. 2004. Regulatory CD4⁺ T cells and the control of autoimmune disease. *Curr Opin Immunol* 16:695-701.
3. Wood, K. J., and S. Sakaguchi. 2003. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 3:199-210.
4. Baecher-Allan, C., and D. A. Hafler. 2004. Suppressor T cells in human diseases. *J Exp Med* 200:273-276.
5. Dieckmann, D., C. H. Bruett, H. Ploettner, M. B. Lutz, and G. Schuler. 2002. Human CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J Exp Med* 196:247-253.
6. Setoguchi, R., S. Hori, T. Takahashi, and S. Sakaguchi. 2005. Homeostatic maintenance of natural Foxp3⁽⁺⁾ CD25⁽⁺⁾ CD4⁽⁺⁾ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med* 201:723-735.
7. Thornton, A. M., E. E. Donovan, C. A. Piccirillo, and E. M. Shevach. 2004. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4⁺CD25⁺ T cell suppressor function. *J Immunol* 172:6519-6523.
8. Thornton, A. M., and E. M. Shevach. 1998. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188:287-296.

9. Walker, L. S., A. Chodos, M. Eggena, H. Doms, and A. K. Abbas. 2003. Antigen-dependent proliferation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in vivo. *J Exp Med* 198:249-258.
10. Fisson, S., G. Darrasse-Jeze, E. Litvinova, F. Septier, D. Klatzmann, R. Liblau, and B. L. Salomon. 2003. Continuous activation of autoreactive CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in the steady state. *J Exp Med* 198:737-746.
11. Banchereau, J., and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
12. Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18:767-811.
13. Steinman, R. M., and M. C. Nussenzweig. 2002. Avoiding horror autotoxicus: The importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2:2.
14. Shortman, K., and Y. J. Liu. 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2:151-161.
15. Voisine, C., F. X. Hubert, B. Trinite, M. Heslan, and R. Josien. 2002. Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *J Immunol* 169:2284-2291.
16. Hubert, F. X., C. Voisine, C. Louvet, M. Heslan, and R. Josien. 2004. Rat plasmacytoid dendritic cells are an abundant subset of MHC class II⁺ CD4⁺CD11b⁻OX62⁻ and type I IFN-producing cells that exhibit selective

- expression of Toll-like receptors 7 and 9 and strong responsiveness to CpG. *J Immunol* 172:7485-7494.
17. Hubert, F.-X., C. Voisine, C. Louvet, A. Ouabed, M. Heslan, and R. Josien. 2006. Differential pattern recognition receptor expression but stereotyped responsiveness in rat spleen dendritic cell subsets. *J Immunol*. 177:1007-1016
 18. Liu, Y. J. 2004. IPC: Professional Type 1 Interferon-Producing Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors. *Annu Rev Immunol*.
 19. Yamazaki, S., T. Iyoda, K. Tarbell, K. Olson, K. Velinzon, K. Inaba, and R. M. Steinman. 2003. Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med* 198:235-247.
 20. Pasare, C., and R. Medzhitov. 2003. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 299:1033-1036.
 21. Jonuleit, H., E. Schmitt, M. Stassen, A. Tuettenberg, J. Knop, and A. H. Enk. 2001. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 193:1285-1294.
 22. Dieckmann, D., H. Plottner, S. Berchtold, T. Berger, and G. Schuler. 2001. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 193:1303-1310.
 23. Kubo, T., R. D. Hatton, J. Oliver, X. Liu, C. O. Elson, and C. T. Weaver. 2004. Regulatory T cell suppression and anergy are differentially

- regulated by proinflammatory cytokines produced by TLR-activated dendritic cells. *J Immunol* 173:7249-7258.
24. Fehervari, Z., and S. Sakaguchi. 2004. Control of Foxp3⁺ CD25⁺CD4⁺ regulatory cell activation and function by dendritic cells. *Int Immunol* 16:1769-1780.
 25. Brinster, C., and E. M. Shevach. 2005. Bone marrow-derived dendritic cells reverse the anergic state of CD4⁺CD25⁺ T cells without reversing their suppressive function. *J Immunol* 175:7332-7340.
 26. Yamazaki, S., M. Patel, A. Harper, A. Bonito, H. Fukuyama, M. Pack, K. V. Tarbell, M. Talmor, J. V. Ravetch, K. Inaba, and R. M. Steinman. 2006. Effective expansion of alloantigen-specific Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by dendritic cells during the mixed leukocyte reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2758-2763.
 27. Fisson, S., F. Djelti, A. Trenado, F. Billiard, R. Liblau, D. Klatzmann, J. L. Cohen, and B. L. Salomon. 2006. Therapeutic potential of self-antigen-specific CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells selected in vitro from a polyclonal repertoire. *Eur J Immunol* 36:817-827.
 28. Hanabuchi, S., N. Watanabe, Y.-H. Wang, Y.-H. Wang, T. Ito, J. Shaw, W. Cao, F. X.-F. Qin, and Y.-J. Liu. 2006. Human plasmacytoid predendritic cells activate NK cells through glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-ligand (GITRL). *Blood* 107:3617-3623.
 29. Ito, T., M. Yang, Y. H. Wang, R. Lande, J. Gregorio, O. A. Perng, X. F. Qin, Y. J. Liu, and M. Gilliet. 2007. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med* 204:105-115.

30. Huber, S., C. Schramm, H. A. Lehr, A. Mann, S. Schmitt, C. Becker, M. Protschka, P. R. Galle, M. F. Neurath, and M. Blessing. 2004. Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. *J Immunol* 173:6526-6531.
31. Peng, Y., Y. Laouar, M. O. Li, E. A. Green, and R. A. Flavell. 2004. TGF-beta regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells responsible for protection against diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4572-4577.
32. Ghiringhelli, F., P. E. Puig, S. Roux, A. Parcellier, E. Schmitt, E. Solary, G. Kroemer, F. Martin, B. Chauffert, and L. Zitvogel. 2005. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med* 202:919-929.
33. Hill, M., S. Tanguy-Royer, P. Royer, C. Chauveau, K. Asghar, L. Tesson, F. Lavainne, S. Remy, R. Brion, F.-X. Hubert, M. Heslan, M. Rimbart, L. Berthelot, J. Moffet, R. Josien, M. Gregoire, and I. Anegon. Indoleamine 2,4-dioxygenase expands human CD4+CD25high regulatory T cells by promoting maturation of LPS-treated dendritic cells. *Eur J Immunol* In press.
34. Munn, D. H., M. D. Sharma, D. Hou, B. Baban, J. R. Lee, S. J. Antonia, J. L. Messina, P. Chandler, P. A. Koni, and A. L. Mellor. 2004. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J Clin Invest* 114:280-290.

35. Sharma, M. D., B. Baban, P. Chandler, D. Y. Hou, N. Singh, H. Yagita, M. Azuma, B. R. Blazar, A. L. Mellor, and D. H. Munn. 2007. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 117:2570-2582.
36. Baecher-Allan, C., V. Viglietta, and D. A. Hafler. 2002. Inhibition of human CD4(+)CD25(+high) regulatory T cell function. *J Immunol* 169:6210-6217.
37. Choi, B. K., J. S. Bae, E. M. Choi, W. J. Kang, S. Sakaguchi, D. S. Vinay, and B. S. Kwon. 2004. 4-1BB-dependent inhibition of immunosuppression by activated CD4+CD25+ T cells. *J Leukoc Biol* 75:785-791.
38. Shimizu, J., S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida, and S. Sakaguchi. 2002. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 3:135-142.
39. Caramalho, I., T. Lopes-Carvalho, D. Ostler, S. Zelenay, M. Haury, and J. Demengeot. 2003. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 197:403-411.
40. Suttmuller, R. P., M. H. den Brok, M. Kramer, E. J. Bennink, L. W. Toonen, B. J. Kullberg, L. A. Joosten, S. Akira, M. G. Netea, and G. J. Adema. 2006. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest* 116:485-494.

41. Peng, G., Z. Guo, Y. Kiniwa, K. S. Voo, W. Peng, T. Fu, D. Y. Wang, Y. Li, H. Y. Wang, and R. F. Wang. 2005. Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4⁺ regulatory T cell function. *Science* 309:1380-1384.
42. Chiffolleau, E., J. M. Heslan, M. Heslan, C. Louvet, T. Condamine, and M. C. Cuturi. 2007. TLR9 ligand enhances proliferation of rat CD4⁺ T cell and modulates suppressive activity mediated by CD4⁺ CD25⁺ T cell. *Int Immunol* 19:193-201.
43. Mahnke, K., S. Ring, T. S. Johnson, S. Schallenberg, K. Schonfeld, V. Storn, T. Bedke, and A. H. Enk. 2007. Induction of immunosuppressive functions of dendritic cells in vivo by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells: role of B7-H3 expression and antigen presentation. *Eur J Immunol* 37:2117-2126.
44. DiPaolo, R. J., C. Brinster, T. S. Davidson, J. Andersson, D. Glass, and E. M. Shevach. 2007. Autoantigen-specific TGFβ-induced Foxp3⁺ regulatory T cells prevent autoimmunity by inhibiting dendritic cells from activating autoreactive T cells. *J Immunol* 179:4685-4693.
45. Bayry, J., F. Triebel, S. V. Kaveri, and D. F. Tough. 2007. Human dendritic cells acquire a semimature phenotype and lymph node homing potential through interaction with CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 178:4184-4193.
46. Tang, Q., J. Y. Adams, A. J. Tooley, M. Bi, B. T. Fife, P. Serra, P. Santamaria, R. M. Locksley, M. F. Krummel, and J. A. Bluestone. 2006. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat Immunol* 7:83-92.

47. Houot, R., I. Perrot, E. Garcia, I. Durand, and S. Lebecque. 2006. Human CD4+CD25^{high} regulatory T cells modulate myeloid but not plasmacytoid dendritic cells activation. *J Immunol* 176:5293-5298.
48. Gilliet, M., and Y. J. Liu. 2002. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 195:695-704.
49. Moseman, E. A., X. Liang, A. J. Dawson, A. Panoskaltsis-Mortari, A. M. Krieg, Y. J. Liu, B. R. Blazar, and W. Chen. 2004. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 173:4433-4442.
50. Yamazaki, S., A. J. Bonito, R. Spisek, M. Dhodapkar, K. Inaba, and R. M. Steinman. 2007. Dendritic cells are specialized accessory cells along with TGF- β for the differentiation of Foxp3⁺ CD4⁺ regulatory T cells from peripheral Foxp3⁻ precursors. *Blood*.
51. Salio, M., M. J. Palmowski, A. Atzberger, I. F. Hermans, and V. Cerundolo. 2004. CpG-matured murine plasmacytoid dendritic cells are capable of in vivo priming of functional CD8 T cell responses to endogenous but not exogenous antigens. *J Exp Med* 199:567-579.
52. Fugier-Vivier, I. J., F. Rezzoug, Y. Huang, A. J. Graul-Layman, C. L. Schanie, H. Xu, P. M. Chilton, and S. T. Ildstad. 2005. Plasmacytoid precursor dendritic cells facilitate allogeneic hematopoietic stem cell engraftment. *J Exp Med* 201:373-383.
53. de Heer, H. J., H. Hammad, T. Soullie, D. Hijdra, N. Vos, M. A. Willart, H. C. Hoogsteden, and B. N. Lambrecht. 2004. Essential role of lung

plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J Exp Med* 200:89-98.

54. Ochando, J. C., C. Homma, Y. Yang, A. Hidalgo, A. Garin, F. Tacke, V. Angeli, Y. Li, P. Boros, Y. Ding, R. Jessberger, G. Trinchieri, S. A. Lira, G. J. Randolph, and J. S. Bromberg. 2006. Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol* 7:652-662.
55. Yoneyama, H., K. Matsuno, Y. Zhang, T. Nishiwaki, M. Kitabatake, S. Ueha, S. Narumi, S. Morikawa, T. Ezaki, B. Lu, C. Gerard, S. Ishikawa, and K. Matsushima. 2004. Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules. *Int Immunol* 16:915-928.

Footnotes

¹ This work was supported by a grant from the Roche Organ Transplantation Research Foundation to RJ (ROTRF, # 415394615). AO was supported by a grant from the Algerian Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique. FXH was supported by a grant from INSERM-Région Pays de la Loire.

² Present address Division of Immunology, The Walter and Elisa Hall Institute of Medical Research, Melbourne, Australia.

³ Address correspondence and reprint requests to Dr. Régis Josien, INSERM U643, ITERT, CHU Hotel Dieu, 30 bld Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 1, France; Email: Regis.Josien@univ-nantes.fr

⁴ Abbreviations used in this paper: Treg, Tregulatory cells; FOX-P3, factor called forkhead box P3; DC, dendritic cells; pDC, plasmacytoid dendritic cells; CFSE, carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester; DDAO-SE, 7-hydroxy-9*H*(1,3-dichloro-9,9-dimethylacridin-2-one), succinimidyl ester; polyI:C, Polyinosinic-polycytidylic acid; mAb, monoclonal antibody; APC-Cy7allophycocyanin-cyanin 7; APC, allophycocyanin; NRS, normal rat serum.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Sorting of CD25⁺ and CD25⁻ CD4⁺ lymph node T cells and FOXP3 expression. Lymph node CD4⁺ T cells (left panels) were obtained by negative and magnetic selection of CD11b/c⁺, NKR-P1A⁺ and CD8⁺ (purity was routinely $\geq 99\%$). Cells were stained with CD8-PE and CD25-Alexa 647 mAb and sorted on a FACS Aria, after gating on CD8⁻ cells, in CD25⁻, CD25^{low} and CD25^{high} CD4⁺ T cells (top panels). FOXP3 expression (blue) was assessed on total CD4⁺ T cells and sorted CD25⁻ and CD25⁺ cells.

Figure. 2. Maturation and subset-dependent regulation of CD4⁺CD25^{high} T cell proliferation by DC. Splenic pDC, OX62⁺CD4⁺ (CD4⁺ DC) and OX62⁺CD4⁻ (CD4⁻ DC) were isolated by FACS. Freshly isolated DC (immature) or DC stimulated overnight with ligands to TLR3 (polyI:C), TLR4 (LPS), TLR7 (Loxoribine); TLR9 (CpG2006), or CD40L were used to stimulate allogeneic CD25⁻ or CD25^{high} CD4⁺ T cells at a ratio of 1:5 in the absence of exogenous IL-2. Proliferation was assessed at day 4. Similar results were obtained in 5 independent experiments.

* $p < 0.05$ (pDC vs. CD4⁺ DC and pDC vs. CD4⁻ DC)

Figure 3. CpG-stimulated pDC, but not OX62⁺ DC, reverse anergy of CD4⁺CD25^{high} T cells in the absence of exogenous IL-2.

A. CD4⁺CD25⁻ (left) and CD4⁺CD25^{high} (right) T cells (2×10^4 /wells in triplicates) were stimulated with increasing numbers of allogeneic CpG-stimulated pDC (squares), CD4⁺ DC (triangles) or CD4⁻ DC (circles) in the absence of exogenous IL-2. Proliferation was assessed at day 4. **B.** CD4⁺CD25⁻ (left) and

CD4⁺CD25^{high} (right) T cells were stimulated with allogeneic CpG-stimulated pDC (squares), CD4⁺ DC (triangles) or CD4⁻ DC (circles) at a ratio of 5:1 in the absence of exogenous IL-2. Proliferation and IL-2 production was assessed from day 2 to day 5. **C.** CD4⁺CD25^{high} T cells were stimulated with syngeneic (white) or allogeneic (black) CpG-stimulated pDC at a ratio of 1:5 in 10% FCS or 2% normal rat serum-supplemented culture medium. Proliferation was assessed on day 3.

Figure 4. CpG-stimulated pDC, but not conventional DC, induce proliferation of CD4⁺CD25^{high} FOXP3⁺ T cells in the absence of exogenous IL-2.

CD25⁻ (top panels) and CD25^{high} (bottom panels) CD4⁺ T cells were labeled with CFSE and stimulated with CpG-matured pDC, CD4⁺ DC or CD4⁻ DC (ratio 5:1). After 4 days, cells were stained with FOXP3-APC mAb and analyzed by FACS.

Figure 5. The effect of exogenous IL-2 on the proliferation of CD25⁻ and CD4⁺CD25^{high} T cells stimulated by allogeneic mature DC.

CD4⁺CD25⁻ (left) and CD4⁺CD25^{high} (right) T cells were stimulated with allogeneic CpG-stimulated pDC (squares), CD4⁺ DC (triangles) or CD4⁻ DC (circles) at a ratio of 5:1 in the absence or presence of increasing concentrations of exogenous IL-2. Proliferation was assessed at day 4. Similar results were obtained in three independent experiments.

Figure 6. Mature pDC-induced Treg proliferation is contact dependent.

Different cell cultures were performed in flat bottom 96-well transwell plates as described in the figure. DC were matured with CpG2006 for 24 hours before used. The proliferation of cells present in the upper chamber (white bars) or the lower chamber (black bar) was assessed on day 4. Note that the proliferation of T cells is globally lower than that described in figure 1 because of the use of flat bottom wells. Similar results were obtained in 2 independent experiments.

Figure 7. Mature pDC-induced Treg proliferation is partially CD86 dependent and IL-2 independent.

CD4⁺CD25⁻ (squares) and CD4⁺CD25^{high} (triangles) T cells were stimulated with allogeneic CpG-stimulated pDC (ratio 1:5) in the absence or presence of increasing concentrations of CTLA4-Ig (A), anti-CD80 (B), anti-CD86 (C) or blocking anti-IL-2 antibodies. Proliferation was assessed after 4 days and the results are expressed as the percentage of proliferation as compared to the culture in the absence of Ab. Similar results were obtained in three independent experiments.

Figure 8. Differential suppressive activity of Treg on effector T cells upon stimulation by various mature DC subsets.

A-C. CD25⁻ and CD4⁺CD25^{high} T cells were stimulated with allogeneic CpG-matured pDC (black bars), CD4⁺ DC (grey bars) or CD4⁻ DC (white bars) at a of ratio 1:5. Suppression assays (right-hand part of each histogram) were performed by adding decreasing numbers of CD4⁺CD25^{high} T cells to a constant number of CD25⁻ cells. After 4 days, the proliferation (**A**), production of IL-2 (**B**) and IFN- γ (**C**) was assessed. Results represent the mean + SD of 5, 5 and 2

experiments for proliferation, IL-2 and IFN- γ , respectively. **D-F**. FACS-sorted CD25⁻ and CD25^{high} CD4⁺ T cells were labeled with DDAO-SE and CFSE, respectively, and stimulated with allogeneic CpG-matured pDC (**D**), CD4⁺ DC (**E**) or CD4⁻ DC (**F**) at a ratio of 5:1. Suppression assays were performed as in A-C. After 4 days, cells were harvested, stained with MHC-II-APC-Cy7 mAb and the percentages of undivided and divided CD25⁻ and CD25^{high} live T cells was assessed after excluding MHC II^{high} cells by FACS by the mean dilution of DDAO-SE or CFSE, respectively. The absolute numbers of DDAO-SE and CFSE-labeled cells in each sample was assessed simultaneously using fluorescent calibrated microbeads. Each bar represent the absolute numbers of either CD25⁻ (left part) or CD25^{high} CD4⁺ T cells and is divided in undivided and divided cells. Note the very low levels of suppression of CD25⁻ cell proliferation by Treg upon stimulation with allogeneic pDC. Similar results were obtained in three independent experiments.

Figure 1

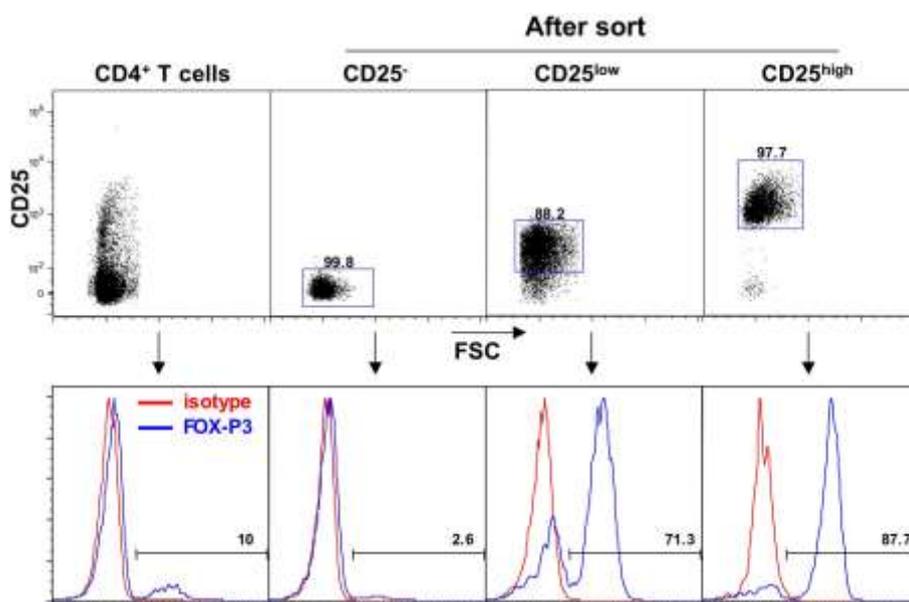


Figure 2

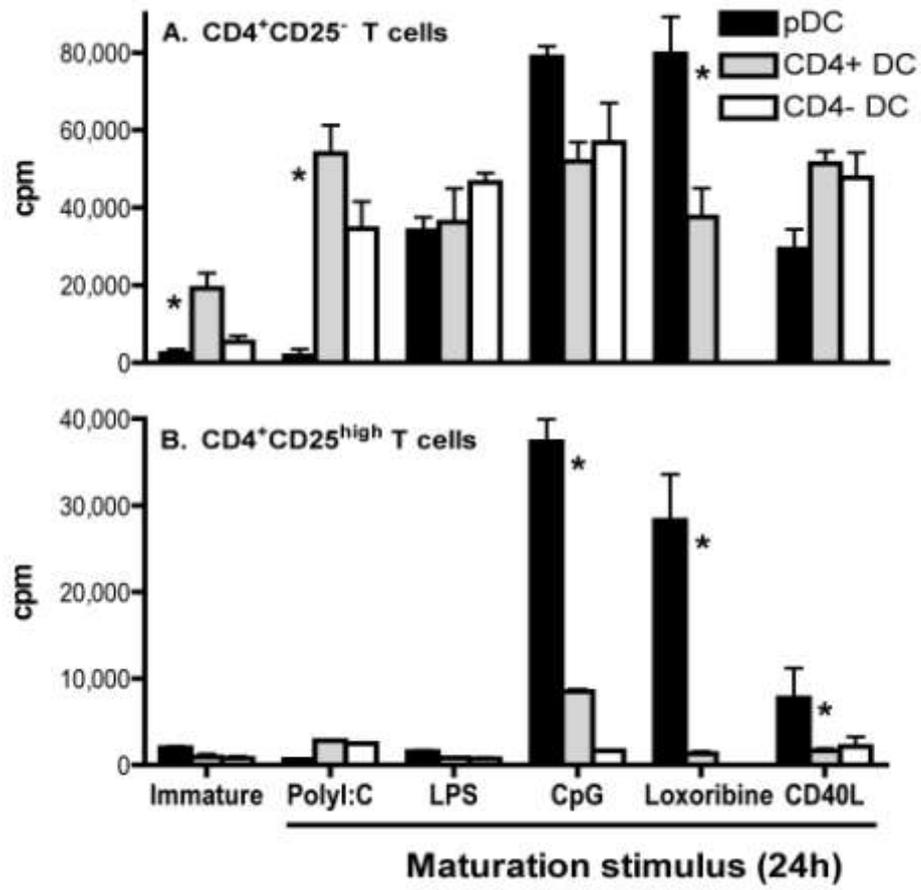


Figure 4

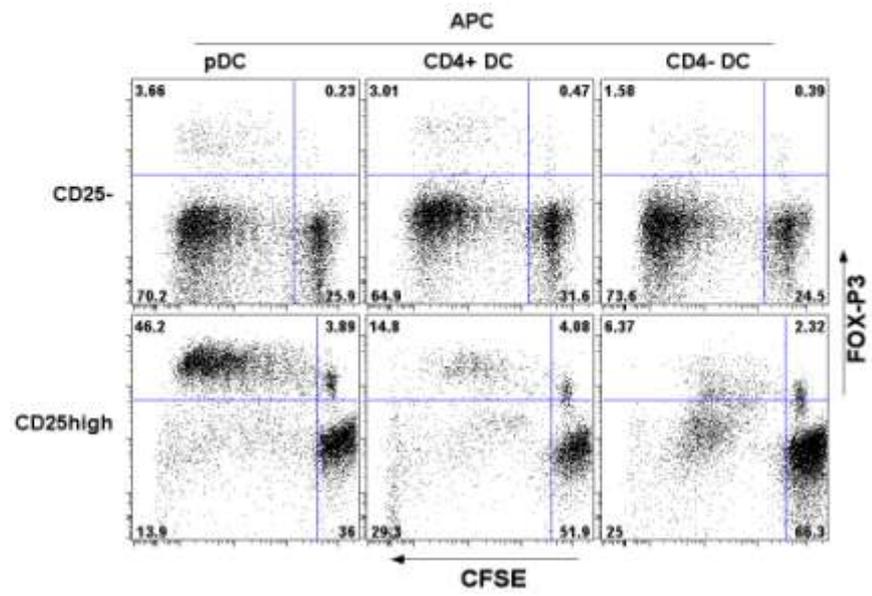


Figure 5

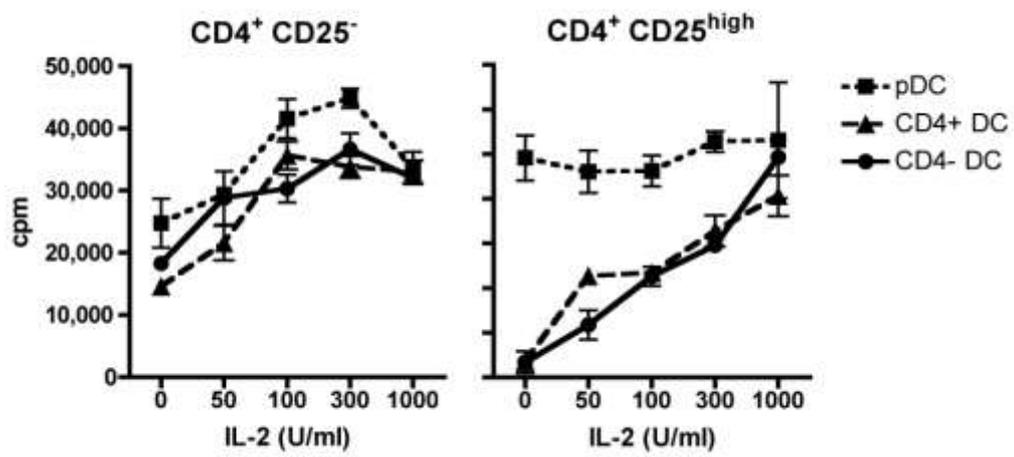


Figure 6

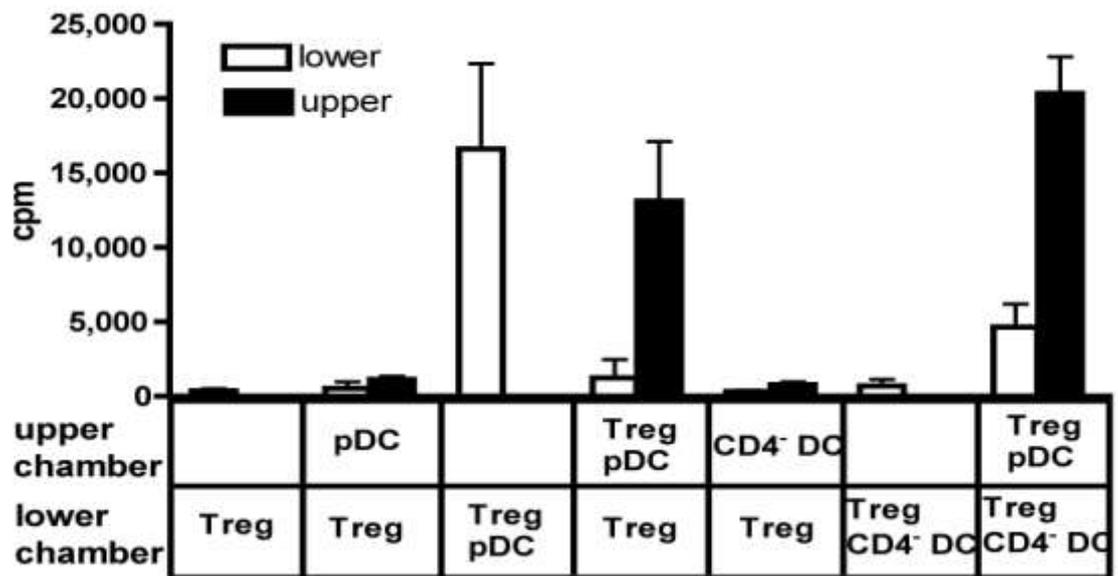


Figure 7

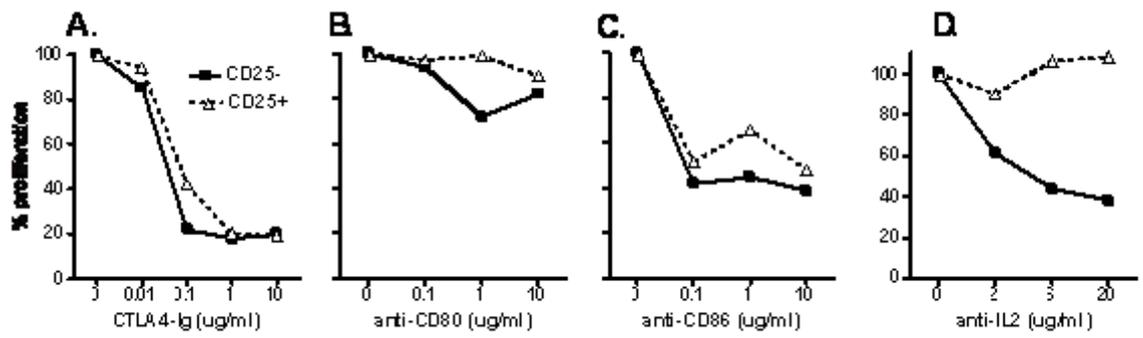
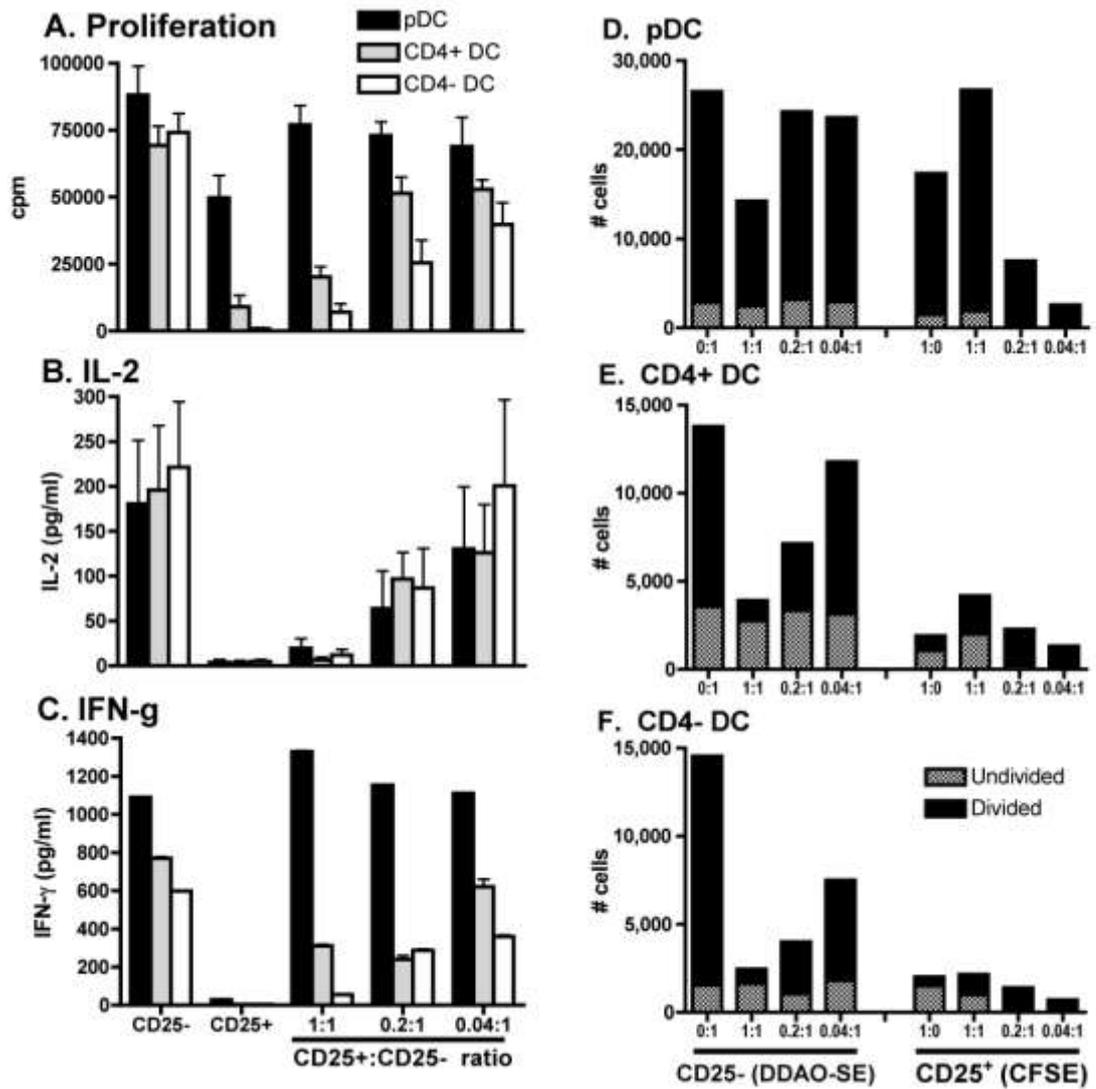


Figure 8



II. 2 Résultats complémentaires

II.2.1 Phénotype des cellules T CD4⁺CD25⁺ et T CD4⁺CD25⁻ dans différents organes de rat

Le phénotype chez le rat des cellules T $CD4^+CD25^+$ et des T $CD4^+CD25^-$ n'est pas très connu malgré le travail de l'équipe de Don Mason (Stephens et al., 2004). Nous avons ainsi dans un premier temps analysé le phénotype de ces cellules afin de pouvoir mieux les identifier et les trier de façon plus efficace. Pour cela nous avons réalisé un FACS 6 couleurs sur des suspensions d'organes lymphoïdes ou de leucocytes circulants après lyse des hématies. La combinaison d'anticorps utilisé était la suivante : X-FITC: ou X correspond à un marqueur de phénotypage ; CD8-PE (clone OX8); CD4-PE-Cy7 (clone OX35); TCR α/β -biotine (clone R7.3) + streptavidine PerCP-Cy5.5; CD25-APC (clone OX39). La lecture se fait comme précédemment décrit sur un FACS Aria. Nous sélectionnons les lymphocytes, puis les cellules vivantes (DAPI négatives) puis les cellules TCR $\alpha\beta^+$ puis les cellules $CD4^+CD8^-$ (Fig.11) car nous avons remarqué dans des expériences préliminaires que les cellules T $CD4^+CD25^+$ contenait une population non négligeable (40%) de cellules T doubles positives CD4 et CD8 (Résultats non montrés). Enfin nous regardons sur les cellules TCD4 $^+$ CD8 $^-$ l'expression du CD25 et d'un marqueur donné.

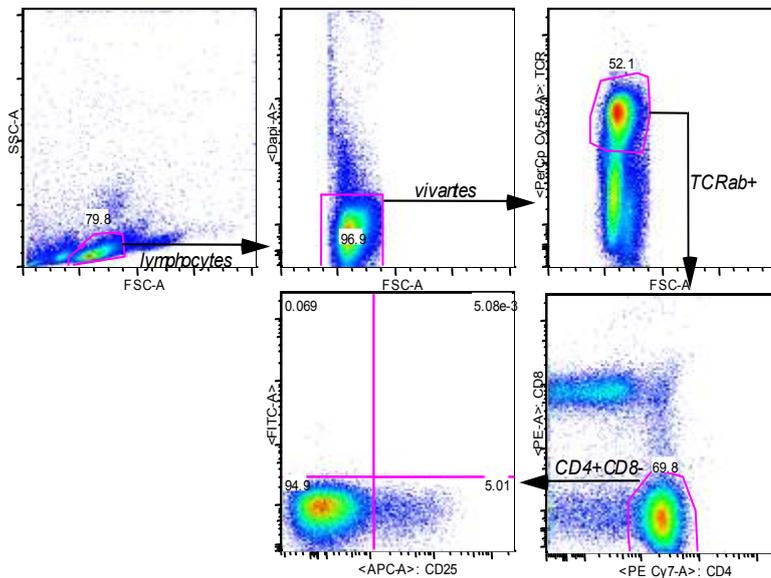
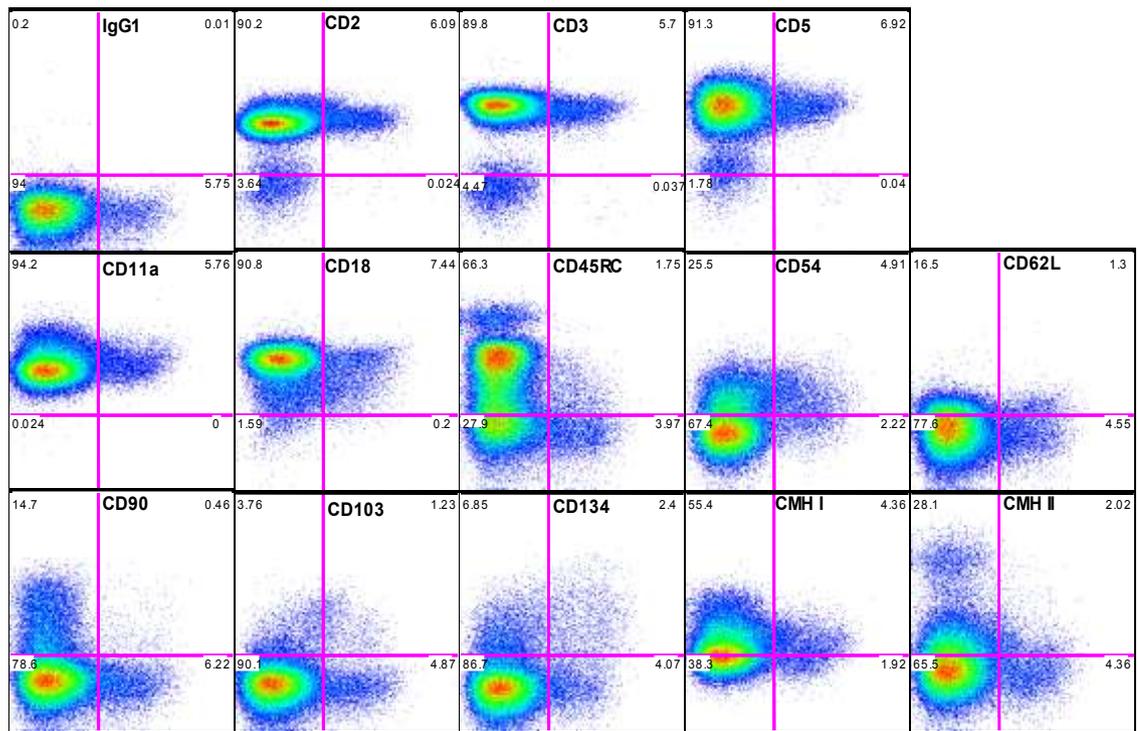


Figure 11. Méthode utilisée pour l'analyse du phénotype des cellules T $CD4^+CD25^+$ et 25^- . Les fenêtres successives réalisées pour cette analyse sont indiquées dans chaque dot plot.

II.2.1.1 Phénotype des cellules T CD4⁺CD25⁺ dans la rate



CD25

Figure 12. Phénotype des cellules T CD4⁺CD25⁺ et CD25⁻ dans la rate. L'analyse se fait sur les cellules TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻ comme décrit dans la figure 11. Chaque dot plot représente l'expression de CD25 en abscisse et du marqueur indiqué dans le dot plot en ordonnée.

Nous constatons que les cellules T CD4⁺CD25⁺ ne représentent que 6% des cellules T CD4⁺CD8⁻. Ces cellules expriment de façon homogène et identique aux cellules CD25⁻ les marqueurs CD2, CD3, CD5, CD11a, CD18 et CMH I. Elles sont CMH II négatifs comme chez l'homme. Les cellules T CD4⁺CD25⁺ sont majoritairement CD45RC faible, CD54 forte et CD90 négative. Chez l'homme, la population T régulatrice semble être contenue dans les cellules CD4⁺CD25^{forte} et CD62L⁺ (Stephens and Mason, 2000). Nous constatons sur la figure 12 que la majorité des cellules T CD4⁺CD25⁺ spléniques est CD62L négative. Comme décrit précédemment (Gavin et al., 2002); (McHugh et al., 2002), environ 1/3 des cellules CD4⁺CD25⁺ expriment la molécule OX40 (CD134). Enfin et contrairement aux

résultats de l' équipe de Don Mason, nous retrouvons une faible proportion de cellules CD103⁺ (clone OX62) dans les cellules CD4⁺CD25⁺ faibles.

II.2.1.2 Phénotype des cellules T CD4⁺CD25⁺ dans les ganglions lymphatiques

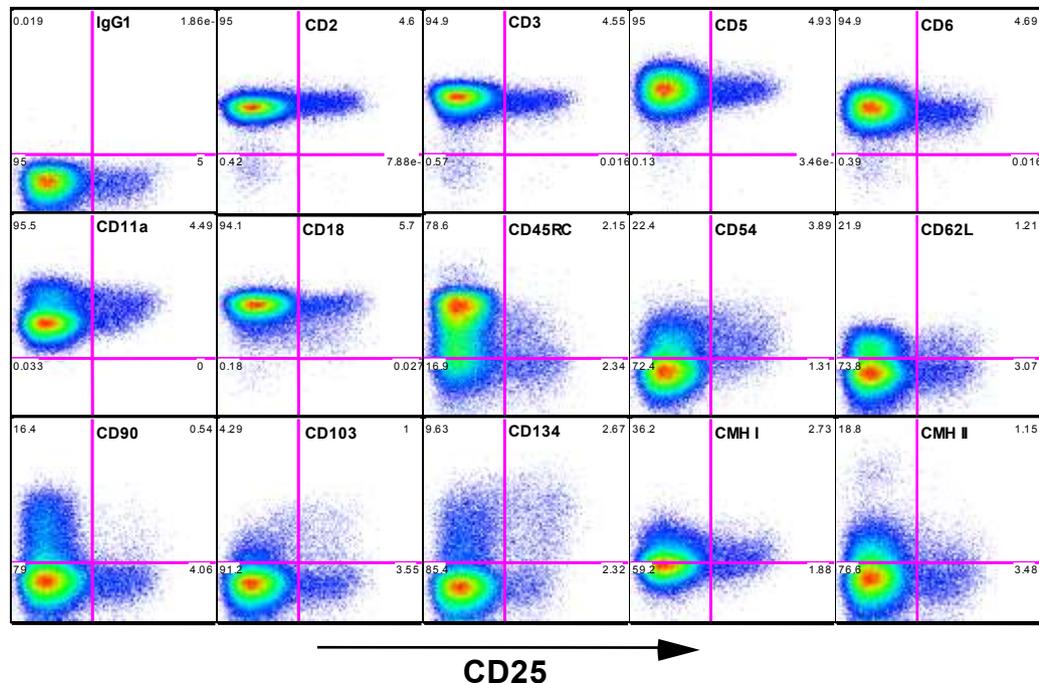


Figure 13. Phénotype des cellules T CD4⁺CD25⁺ et CD25⁻ dans les ganglions lymphatiques

Dans les ganglions, les T CD4⁺ CD25⁺ représentent 5% des cellules T CD4⁺. Leur phénotype est équivalent à celui des cellules spléniques. Cependant la proportion de cellules exprimant OX40 est plus importante (>50%) et la proportion de cellules exprimant CD103 est plus faible.

Nous avons trouvé qu'une proportion importante (environ 40%) des cellules TCD4⁺ CD25⁺ dans les organes lymphoïdes chez le rat était des cellules doubles positives CD4⁺ CD8⁺ correspondant probablement à des émigrants thymiques récents.

II.2.1.3 Phénotype des cellules T CD4⁺CD25⁺ dans le sang

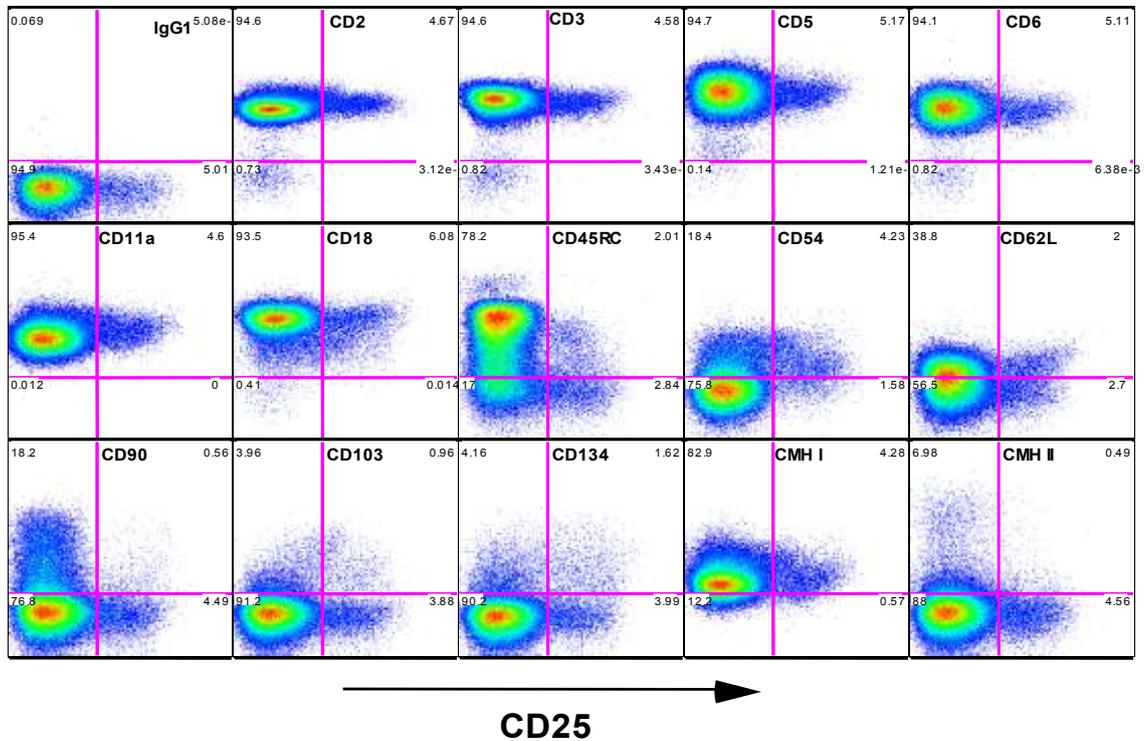


Figure 14. Phénotype des cellules T CD4⁺CD25⁺ et CD25⁻ dans le sang.

La proportion de cellules T CD4⁺CD25⁺ est très proche de celles trouvées dans les ganglions et la rate. Il existe dans le sang une proportion beaucoup plus importante de cellules exprimant CD62L et une proportion moindre de cellules exprimant OX40.

II.2.2 Purification des cellules T CD4⁺ CD25⁺

Comme chez l'homme et chez la souris, les cellules T CD4⁺ CD25⁺ du rat ont une activité régulatrice in vitro et in vivo (Jonuleit and Schmitt, 2003). Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour isoler ces cellules à partir du sang ou d'une suspension d'organes lymphoïdes.

II.2.2.1 Par billes

L'isolement par billes magnétiques ne nous a pas permis d'obtenir une pureté supérieure à 85% et de plus ne permet pas de trier les cellules exprimant différents niveaux de CD25 ($CD25^{high}$ vs $CD25^{low}$) (résultats non montrés).

II.2.2.2 Par cytométrie en flux

Le tri par cytométrie en flux haute vitesse (BD FACS Aria) permet d'obtenir des enrichissements supérieurs à 98% (Figure 15) et de séparer efficacement les cellules $CD25^{high}$ des $CD25^{low}$ (Figure 16). La viabilité et la fonctionnalité des cellules est excellente.

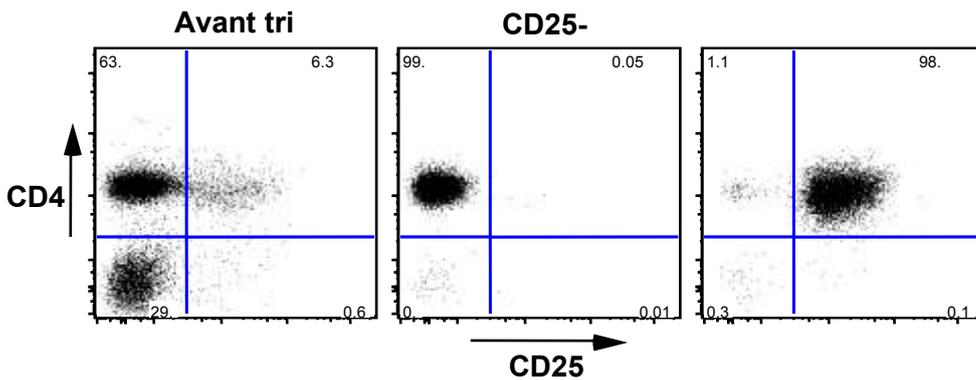


Figure 15. Tri des cellules T $CD4^{+}CD25^{+}$. La suspension de cellules de ganglions lymphatiques est marquée avec CD6-FITC, CD8-PE, CD4-PE-Cy7 et CD25-Alexa 647 et triée par cytofluométrie en flux. Les dots blot représentent l'expression de CD4 et CD25 sur les cellules T avant tri et après tri ($CD25^{-}$ et $CD25^{+}$).

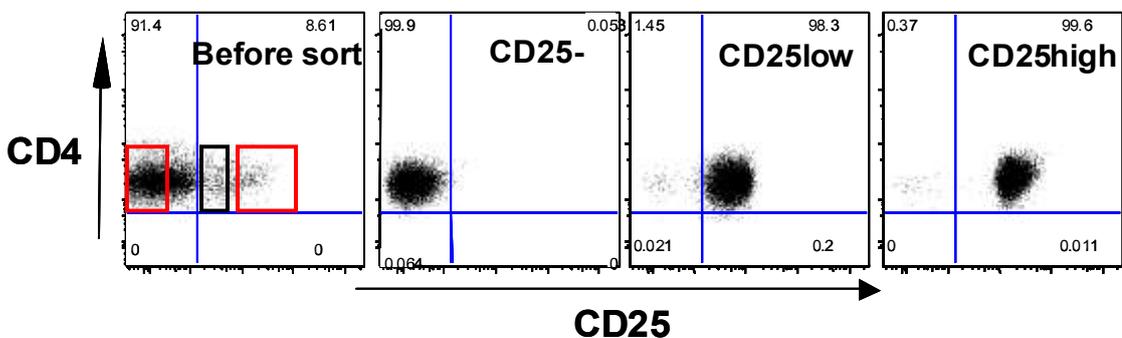


Figure 16. Tri des cellules TCD4⁺ CD25⁻, CD4⁺CD25^{faible} et TCD4⁺CD25^{forte}. Les ganglions après lyse des globules rouges sont marqués au CD6-FITC, CD8-PE, CD4-PECy7, CD25-Alexa 647. Nous trions sur les cellules CD4⁺CD8⁻ les 3 populations T selon l'expression du CD25. Ceci est le résultat obtenu après le tri.

II.2.3 Capacité proliférative des cellules TCD4⁺ CD25⁺ et CD4⁺ CD25⁻ de la rate et des ganglions induite par les DC matures

Nous avons vérifié que les cellules T CD4⁺CD25⁺ de la rate et des ganglions lymphatiques avait des réponse équivalentes. Comme précédemment, les sous populations de DC ont été stimulées via différents ligand des TLR et utilisées en RLM. La encore nous n'avons pas pu obtenir suffisamment de DC CD4⁻ pour réaliser toutes les conditions expérimentales.

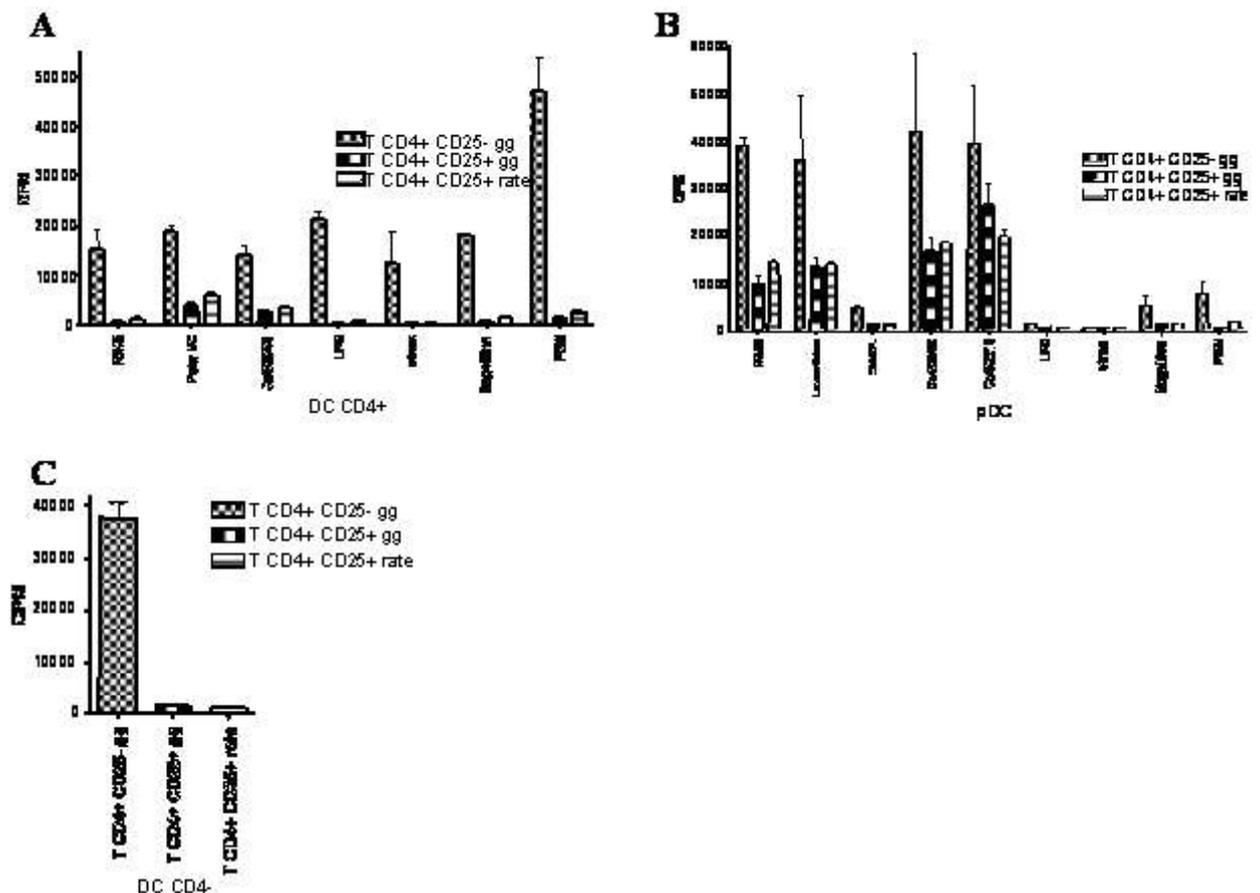


Figure 17. Prolifération des cellules T CD4⁺CD25⁺ et T CD4⁺CD25⁻ allogéniques de la rate et des ganglions induite par les sous populations de DC. Les DC ont été cultivées ou non pendant 24 h en présence de différents stimuli puis mis en culture avec les T CD4⁺CD25⁻ et T CD4⁺CD25⁺ des ganglions ou de la rate. La prolifération

lymphocytaire est mesurée au bout de 4 jours. Le ratio utilisé est de 1 DC pour 5 cellules T.

Nous observons sur la figure 17 que les T CD4⁺CD25⁺ des ganglions et de la rate se comportent de façon identique en réponse à une stimulation par les différentes sous populations de DC. Les pDC induisent toujours la plus forte stimulation des T CD4⁺CD25⁺ quand elles sont stimulées avec les ligands des TLR7 (loxoribine, R848) et 9 (CpG). Les ligands de TLR 2 (PGN), 4 (LPS) ou 5 (flagelline) n'ont aucun effet. De plus la stimulation par du virus influenza qui induit une forte production d'IFN de type I ne permet pas aux pDC de stimuler les cellules T CD4⁺CD25⁺ suggérant que l'effet observé avec le GpG2216 ne dépend pas de la production d'IFN de type I. Les DC CD4⁻ sont encore une fois incapables de stimuler les cellules T CD4⁺CD25⁺ tandis que les DC CD4⁺ stimulées par via le TLR3 ou 9 induisent une réponse intermédiaire mais 3 à 4 fois inférieures à celles induite par les pDC.

II.2.4 Analyse de l'effet suppresseur des cellules T CD4⁺CD25⁺

II.2.4.1 Test de suppression in vitro après stimulation par anti-CD3 et anti-CD28

Après tri des cellules T CD4⁺CD25⁻ des ganglions et CD4⁺CD25⁺ des ganglions ou de la rate, nous analysons d'une part la capacité proliférative des cellules seules et d'autre part l'effet suppressif des cellules T CD4⁺CD25⁺ sur les cellules T CD4⁺CD25⁻ par une diminution de la prolifération totale (Fig. 19). La stimulation non spécifique s'effectue par un anticorps anti-CD3 immobilisé et un anticorps anti-CD28 soluble.

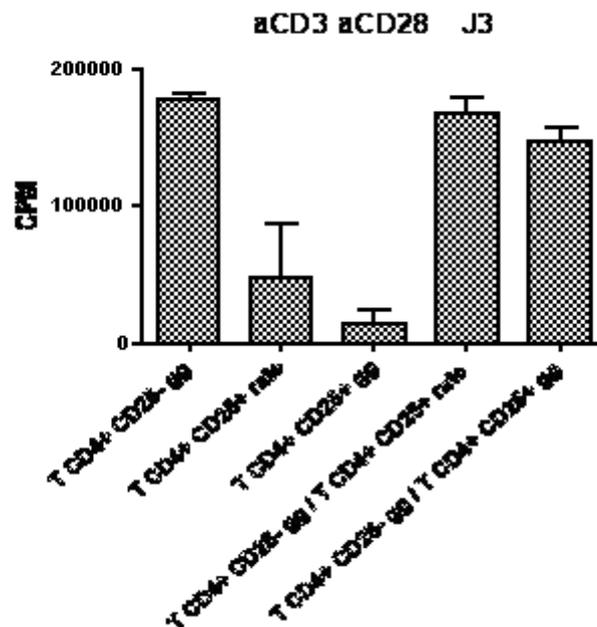


Figure 18. Analyse de l'effet suppresseur des cellules TCD4⁺ CD25⁺ sur les TCD4⁺CD25⁻ Une plaque de 96 puits à fond plats est chargée avec 30 µl d'anti-CD3 par puits à 5 µg/ml durant 2 heures à 37°C. Après trois lavage de la plaque avec du PBS, les cellules TCD4⁺CD25⁺ ou CD4⁺CD25⁻ de la rate et des ganglions sont déposées à une concentration de 50000 /puits, avec de l'anti-CD28 à 2,6 µg/ml. La culture est incubée pendant 3 jours à 37°C et la prolifération analysée par incorporation de thymidine tritiée. Les cellules T CD4⁺ CD25⁺ de la rate ou des ganglions sont hypoprolifératives en comparaison aux cellules T CD4⁺CD25⁻ des ganglions. Cependant, quand les deux types de cellules T sont co-cultivées au ratio de 1:1, l'effet suppressif des cellules T CD4⁺CD25⁺ sur les cellules T CD4⁺CD25⁻ demeure très faible voir inexistant. Ceci indique que les conditions du test in vitro (quand on coate sur du plastique) ne permettent pas de détecter d'effet suppresseur des cellules T CD4⁺CD25⁺.

II.2.4.2 Test de suppression in vivo après stimulation par les pDC matures du donneur

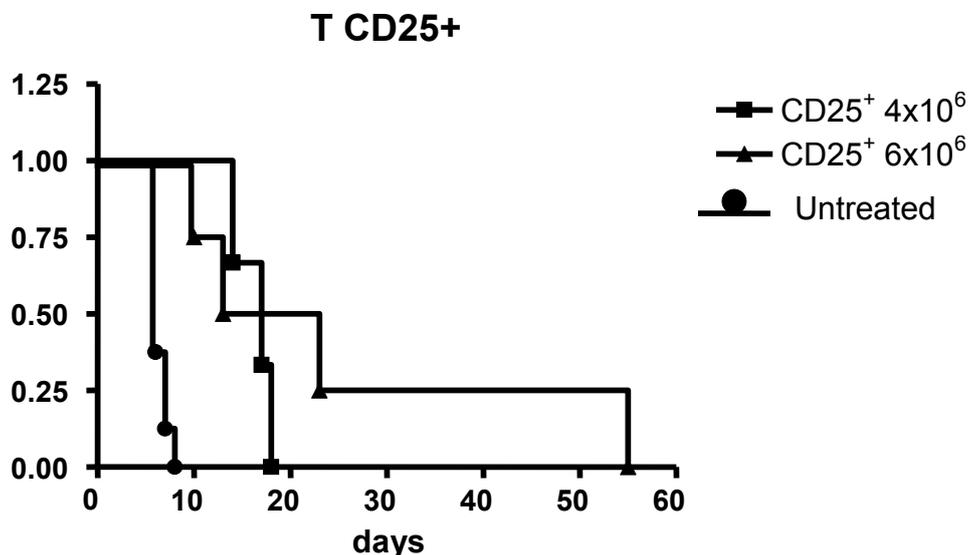


Figure 19. Analyse de l'activité suppressive des TCD4⁺ CD25⁺ in vivo après stimulation par les pDC matures du donneur

Plusieurs résultats suggèrent que les pDC matures pourraient expandre ex vivo des Treg allogéniques. Nous avons donc voulu savoir si on pouvait utiliser des pDC

matures pour expandre de grandes quantités de T reg allogéniques et les injecter in vivo, pour induire une tolérance à l'allogreffe dans un modèle cardiaque chez le rat et voir si ces T reg pouvaient avoir une fonction régulatrice.

Les cellules TCD4⁺ CD25⁺ (T reg) de rat Lewis 1A ont été stimulées par les pDC matures de rat Lewis 1W deux fois à une semaine d'intervalle sans IL-2. Ensuite les cellules ont été maintenues en culture avec de l'IL-2 (50U/ml). Pour analyser l'activité suppressive, in vivo, des Treg stimulés par les pDC du donneur, nous avons procédé au transfert des T reg dans un modèle d'allogreffe cardiaque. Les cellules sont injectées en intra-veineuse (IV) quelques heures après la greffe à des rats non irradiés et non immuno-supprimés (n'ayant pas subi d'immunosuppresseurs). Dans cette expérience, nous avons observé que le transfert de 4 à 6 millions de cellules TCD4⁺ CD25⁺ (T reg) induit une survie significativement plus longue du greffon (ou de l'allogreffe). Cette survie du greffon est constatée par une palpation abdominale quotidienne du cœur greffé.

Dans notre modèle animal, il nous reste à déterminer la spécificité des T reg du receveur vis-à-vis du greffon du donneur d'une tierce partie. Nous avons essayé de reproduire, in vitro, chez l'homme les résultats obtenus chez le rat. Malheureusement aucune population de DC ne stimule de façon efficace les T reg. Ceci peut être dû à l'origine des DC (obtenues du sang chez l'homme et de la rate chez le rat), ou à l'origine des lymphocytes T (obtenues du sang chez l'homme et des ganglions chez le rat). Par ailleurs, il a été montré chez l'homme qu'il était possible d'induire, in vitro, la prolifération des T reg en utilisant une stimulation avec des CPA et des fortes doses d'IL-2 (Hoffmann et al., 2004). Récemment, il a été montré dans un modèle murin que la rapamycine induisait la prolifération des cellules TCD4⁺ CD25⁺ (Battaglia et al., 2005). Ces médicaments pourraient être un complément aux injections de T reg cultivées. De plus, il faut déterminer la fréquence d'injection ainsi que la quantité de Treg nécessaires au maintien du greffon.

Discussion

Bien que les DC aient été découvertes il y a une trentaine d'années, ce n'est que dans la dernière décennie que leur rôle essentiel dans le contrôle des réponses immunitaires a été formellement reconnu.

Les DC sont reconnues comme étant les principales cellules présentatrices de l'antigène car ce sont les seules cellules présentatrices capables de stimuler les cellules T naïves (Banchereau and Steinman, 1998). Elles jouent donc un rôle central dans l'initiation des réponses immunitaires, mais elles sont également importantes dans la tolérance des cellules T (Shortman and Liu, 2002). Il reste de nombreuses inconnues qui font l'objet de recherches actuellement. Ainsi, il reste à élucider les mécanismes d'action précis des DC dans la tolérance des cellules T et la compréhension de ces mécanismes pourrait ouvrir le champ à de nouvelles thérapies dans le domaine des maladies auto-immunes et de la transplantation.

Dans toutes les espèces, les DC peuvent être subdivisées en plusieurs populations selon l'expression de différents marqueurs de surface, mais aussi selon leur propriété en termes d'acquisition de l'antigène et d'activation des cellules T. Notre équipe étudie depuis maintenant quelques années les sous-populations de DC chez le rat. L'étude des DC, fraîchement extraites des organes lymphoïdes a montré qu'il existe plusieurs sous-populations de DC dans la rate et a confirmé l'hétérogénéité de ces cellules chez le rat. Alors qu'il a été décrit chez la souris quatre populations de DC dans la rate et cinq dans les ganglions, trois populations de DC chez le rat ont été définies selon l'expression des marqueurs CD4, C11b et CD103 dans la rate comme dans les ganglions : les populations DC CD4⁻ CD11b⁺ CD103⁺ (DC CD4⁻) et DC CD4⁺ CD11b⁺ CD103⁺ (DC CD4⁺) et une population DC CD4⁺ CD11b⁻ CD103⁻ qui correspond aux DC plasmacytoïdes (pDC).

Les DC CD4⁻ expriment le CD11c, fortement CD103 (OX62), sont négatives pour le SIRP α et pour les antigènes lymphoïdes comme le CD3 et le CD5, mais

expriment de faibles quantités de CD90. Ces DC ont un phénotype relativement immature qui se traduit par une faible expression des molécules du CMH de classe II et l'absence d'expression des molécules de costimulation. Cependant, une fois placées en culture ces cellules subissent une maturation spontanée se traduisant par une forte expression du CMH de classe II et une augmentation des molécules de CD80, CD86 et CD40. Les DC CD4⁻ sont capables de produire de grandes quantités d'IL-12 en réponse à des stimuli tel le CD40L, le LPS, le SAC ou le CpG. Leur sensibilité à ces différents stimuli reflète leur expression d'un large répertoire de TLR (TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). Les DC CD4⁻ induisent une prolifération et une différenciation, *in vitro*, des cellules TCD4 allogéniques en cellules Th1. De plus, cette population de DC se caractérise par une activité cytotoxique contre des cellules tumorales, *in vitro*, dont le mécanisme est indépendant du Ca²⁺ et des caspases.

Les DC CD4⁺ expriment les marqueurs CD5 et SIRPα et ont, comme les DC CD4⁻, un phénotype relativement immature avec cependant une faible expression du CD80. Elles possèdent un profil d'expression des TLR relativement similaire aux DC CD4⁻ mais expriment aussi plus de TLR 8 et de TLR 9 que les DC CD4⁻. Les DC CD4⁺ induisent la prolifération et la différenciation des lymphocytes TCD4 en cellules Th1/Th0 et induisent des cellules T CD8 produisant de grandes quantités d'IFN γ

Les pDC n'expriment pas OX62, CD11c, ni le CD11b mais sont positives pour des marqueurs lymphoïdes, comme le CD45, CD5 et le CD90, CD45R et myéloïdes comme CD200 et le SIRP α . Le phénotype des pDC est immature avec une absence de CD80 et une très faible expression de CD86 et du CMH de classe II. Les pDC sécrètent d'énormes quantités d'IFN de type I et de cytokines proinflammatoires en réponse à une stimulation virale et, une fois matures, stimulent efficacement des cellules T, jouant donc un rôle essentiel au cours de certaines réponses immunitaires. Elles produisent également de l'IL-12p40, après stimulation avec des CpG ou du CD40L, et du TNF- α et de l'IL-6. Il est intéressant de noter que les pDC sont les seules DC à produire de l'IL-6 chez le rat. Les pDC expriment de façon spécifique les TLR 7 et 9 comme les pDC humaines, ce qui leur confère une réponse spécifique à certains déterminants pathogéniques (Kadowaki et al., 2001). Certains auteurs ont démontré chez l'homme que des pDC stimulés par CD40L pouvaient entraîner la différenciation des cellules T régulatrices CD8⁺ (Gilliet and Liu, 2002a). En revanche le rôle des différentes sous-populations de DC dans l'homéostasie et l'activation des cellules T régulatrices

naturelles CD4⁺ CD25⁺ n'a pas été exploré. Bien que les mécanismes d'activation in vivo des cellules TCD4⁺ CD25⁺ soient inconnus, in vitro ces cellules sont réputées hypoprolifératives en réponse à des stimulations spécifiques ou non spécifiques (Thornton and Shevach, 1998). D'autres études faites ont pu montrer que in vivo les cellules T régulatrices peuvent néanmoins proliférer activement dans les zones T des organes lymphoïdes (Yamazaki et al., 2003); (Fisson et al., 2003). Or, ces zones T contiennent aussi les différentes sous-populations de DC dont les pDC qui peuvent interagir avec ces cellules T. Les cellules TCD4⁺ CD25⁺ présentent un intérêt thérapeutique très important en transplantation d'organe ou de cellules mais également dans les maladies auto-immunes. La compréhension de leurs mécanismes d'activation et d'expansion est donc nécessaire.

Notre objectif dans cette étude était donc de déterminer l'influence de différentes sous-populations de DC sur la réponse proliférative et l'activité suppressive des cellules TCD4⁺ CD25⁺ chez le rat et de tester notamment le rôle des pDC.

Nos résultats indiquent que, les trois sous populations de DC matures induisent une forte prolifération des cellules TCD4⁺ CD25⁻ allogéniques mais que, contrairement aux DC dites conventionnelles (DC CD4⁺ et CD4⁻), les pDC matures stimulées via TLR 7 ou 9 induisent en absence d'IL-2 exogène une forte prolifération des cellules TCD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺. Cette prolifération est indépendante de L'IL-2, nécessite est un contact cellulaire et est partiellement dépendante de CD86.

Dans un premier temps, nous avons analysé la fréquence de trois sous-populations de DC spléniques, DC CD4⁺, DC CD4⁻ et pDC que notre équipe a identifié chez différentes souches de rat (Voisine et al., 2002); (Hubert et al., 2004). Cette analyse nous a permis de choisir la souche de rat Lewis qui représente la meilleure source pour les pDC qui constituent 1,8% des cellules spléniques. Notre travail montre que les différences principales entre les souches de rat porte sur la fréquence des pDC. Une étude a démontré d'importantes différences dans la fréquence des pDC entre différentes souches de souris (Asselin-Paturel et al., 2001). Dans notre étude nous avons pu mettre au point une technique globale de purification des sous-populations de DC spléniques avec une bonne viabilité.

Nous avons ensuite analysé le phénotype des cellules T CD4⁺CD25⁺ et T CD4⁺CD25⁻ dans différents organes afin de mieux les identifier et les trier de façon plus efficace. Nous avons trouvé qu'une proportion importante (environ 40%) des cellules T CD4⁺CD25⁺ dans les organes lymphoïdes chez le rat étaient des cellules double

positives CD4⁺CD8⁺ qui correspondent probablement à des émigrants thymiques récents. Dans la rate nous avons constaté que les cellules T CD4⁺CD25⁺ et TCD4⁺CD25⁻ exprimaient de façon homogène les marqueurs CD2, CD3, CD5, CD11a, CD18 et CMH I et que les cellules TCD4⁺CD25⁺ sont CD45RC faibles et CD90 négatives. Il est connu que chez l'homme, les cellules T régulatrices sont contenues dans les cellules de phénotype CD4⁺ CD25^{fort} et CD62L⁺ (Stephens and Mason, 2000). Nos résultats montrent que la majorité des cellules T CD4⁺CD25⁺ spléniques sont CD62L négative. Contrairement aux résultats de l'équipe de Don Mason (Stephens et al., 2004), nous avons retrouvé dans les cellules CD4⁺CD25^{faible} un faible pourcentage de cellules CD103⁺. Ceci est intéressant car ce marqueur a été proposé comme marqueur des cellules T régulatrices chez l'homme (Lehmann et al., 2002). Or, chez le rat, CD103 est un marqueur relativement spécifique des cellules dendritiques. Dans les ganglions, nous n'avons pas constaté de différences majeures avec les cellules T CD4⁺CD25⁺ spléniques, à l'exception du marqueur OX40 (CD134) qui est exprimé sur plus de cellules. Enfin, dans le sang, la différence essentielle est qu'une proportion plus importante de cellules T CD4⁺CD25⁺ expriment le marqueur CD62L (environ 50%). Le CD62L est la L-sélectine, une molécule d'adhésion exprimée notamment sur les cellules T naïves, qui permet leur migration vers les ganglions lymphatiques au travers des veinules post capillaires qui expriment le ligand de CD62L (Girard and Springer, 1995).

La technique employée pour la purification des cellules T CD4⁺CD25⁺ à partir du sang ou d'organes lymphoïdes a été mise au point après utilisation de plusieurs techniques, et nous avons pu obtenir une meilleure pureté et une séparation des cellules CD25^{fortes} des CD25^{faibles} par tri cytométrie en flux.

Le test de l'activité stimulatrice (RLM) des trois sous-populations de DC spléniques matures sur des cellules T CD4⁺CD25⁺ et T CD4⁺CD25⁻ montre que les trois sous-populations de DC matures induisent une forte prolifération des cellules T CD4⁺CD25⁻ et que les DC OX62⁺CD4⁺ sont les meilleures cellules stimulatrices dans ces conditions. Néanmoins les différences restent modestes et ne sont pas toujours retrouvées. Les pDC matures sont dans toutes les expériences que nous avons réalisé les meilleures cellules stimulatrices des cellules T CD4⁺CD25⁺ FOXP3⁺ qui sont ainsi capables de proliférer activement in vitro. Les DC OX62⁺CD4⁻ sont toujours incapables de faire proliférer les cellules T CD4⁺CD25⁺ tandis que les DC OX62⁺CD4⁺ sont capables notamment après stimulation via le TLR3 d'induire une prolifération modeste des cellules T CD4⁺CD25⁺. Nous avons trouvé que la prolifération des cellules

T CD4⁺CD25⁺ FOXP3⁺ allogéniques était induite spécifiquement par les pDC lorsque celles-ci ont été stimulées via TLR 7 ou 9 et indépendamment d'IL-2 exogène. Il a été montré que les cellules T CD4⁺CD25⁺ naturelles chez l'homme expriment le TLR 4 (récepteur du LPS) et peuvent proliférer en présence de forte concentration de LPS (Sakaguchi, 2004). Le fait que les pDC stimulées avec du LPS n'induisent pas de prolifération des cellules T CD4⁺CD25⁺ indique que la prolifération de ces cellules n'est pas due à la présence de LPS qui pourrait persister en très faible quantité malgré les lavages des DC avant la RLM. Nous pouvons aussi constater qu'il n'existe pas de différence de prolifération entre les cellules T CD4⁺CD25^{faible} et T CD4⁺CD25^{forte} en RLM suggérant que les Treg chez le rat sont contenues dans les T CD4⁺CD25^{faible} et forte.

L'effet suppresseur des cellules T CD4⁺CD25⁺ in vitro n'a pas été montré dans un test de stimulation par anti-CD3 et anti-CD28 et cela peut être dû aux conditions du test in vitro. Un second test in vitro en RLM avec différentes sous populations de DC et avec un nombre croissant de T CD4⁺CD25⁺, permet de constater qu'une suppression de la réponse proliférative des cellules T CD4⁺CD25⁻ allogéniques n'est observé qu'avec des DC qui n'entraînent pas de prolifération des cellules T CD4⁺CD25⁺. Nous pouvons dire ainsi que l'activité suppressive des cellules T régulatrices (T CD4⁺CD25⁺) peut être modulée en fonction du type de DC utilisée pour stimuler les cellules T. Nous avons pu déterminer le ratio DC : T le plus approprié pour les tests de stimulation. L'analyse des résultats montre aussi que l'expansion des T reg par les pDC matures est associée à une inhibition simultanée de leur activité suppressive.

Dans une étude, les cellules T CD4⁺CD25⁺ naturelles peuvent avoir un effet suppressif sur la réponse proliférative des cellules T CD4⁺CD25⁻ via un mécanisme de contact cellulaire (Zheng et al., 2004). Nous avons démontré que l'expansion ou la prolifération des Treg nécessite un contact cellulaire et est partiellement dépendante de CD86. La différence observée dans la capacité des DC matures à expandre les Treg est probablement liée aux molécules de costimulation exprimées spécifiquement par les pDC ou bien une autre possibilité qui suppose que les pDC manquent de molécules de surface exprimées par les DC conventionnelles qui sont responsables de l'induction de l'anergie des Treg. Notre équipe travaille actuellement sur les molécules impliquées dans l'expansion des Treg par les pDC. Il a été montré, que les pDC humaines expriment GITR-L et ICOSL (Hanabuchi et al., 2006); (Ito et al., 2007). ICOS est impliqué dans la capacité des pDC à induire la différenciation des cellules Treg

productrices d'IL-10 (Hanabuchi et al., 2006); (Ito et al., 2007). TGF- β joue aussi un rôle dans l'expansion des Treg in vivo (Huber et al., 2004); (Ghiringhelli et al., 2005). Nous analyserons le rôle de différentes molécules décrites pour réguler la fonction des Treg telles que GITR (Hanabuchi et al., 2006), TRANCE (Green et al., 2002). Pour cela, nous comparerons le profil global d'expression de gènes dans les différentes populations de DC immatures et matures par puces à ADN spécifiques du rat. Les gènes différentiellement exprimés seront analysés ensuite par PCR quantitative.

Des études faites chez la souris suggèrent que l'activité suppressive des Treg est principalement contrôlée par l'état de maturation des DC (Pasare and Medzhitov, 2003). L'étude de Brinster et al a montré que les BMDC matures induisent la prolifération des cellules CD4⁺ CD25⁺ qui suppriment L'IL-2 produite par les cellules T effectrices (Brinster and Shevach, 2005). Nos résultats montrent que les populations de DC ont également un impact différent sur l'activité suppressive des Treg in vitro. En effet, en présence de DC conventionnelles matures, les Treg suppriment fortement la prolifération et la production d'IL-2 et d'IFN- γ par les cellules T effectrices alors qu'en présence de pDC, les Treg suppriment la production d'IL-2 mais pas la prolifération ni la production d'IFN- γ des cellules T effectrices. Nos résultats suggèrent que les pDC matures peuvent induire la prolifération des cellules T effectrices indépendamment d'IL-2 et que les T reg sont incapable d'inhiber la différenciation Th1 induite par les pDC.

Concernant le rôle ou les fonction des DC dans l'immunité, il est possible d'après nos travaux et la littérature d'émettre des hypothèses sur l'interaction des différentes DC entre elles selon le type d'antigène qu'elles rencontrent. Prenons exemple l'ADN aux motifs CpG de type B qui pouvaient induire l'activation des trois populations de DC. Ces dernières vont induire une réponse Th1 probablement par la production d'IL-12 par les DC CD4⁻ et les pDC (Murphy et al., 2000). Les cellules proinflammatoires vont permettre le recrutement d'autres cellules de l'immunité telles que les NK (Gerosa et al., 2002), NKT (Kawano et al., 1997) et B (Poeck et al., 2004). En même temps, les pDC sécrètent aussi d'autres cytokines telles que TNF- α et l'IL-6. L'IL-6 pourrait agir sur la différenciation des cellules B en plasmocytes (Jego et al., 2003) mais pourrait aussi inhiber l'action des Treg (Pasare and Medzhitov, 2003). Afin de réguler la réponse immunitaire induite contre la présence de CpG, les pDC, mais aussi dans une moindre mesure les DCCD4⁺, induisant l'expansion du pool de T reg, qui agira, après s'être multiplié et une fois la quantité d'IL-6 environnante diminuée, sur les cellules T freinant

et régulant la réponse immunitaire. On retrouve aussi d'une certaine manière l'activité régulatrice des pDC. Ce type de réponse et de régulation n'arrive probablement qu'en présence de bactéries ou de virus.

Ces résultats obtenus dans notre étude présentent plusieurs intérêts. Premièrement, ils démontrent que sur le plan technique, les conditions utilisées *in vitro* pour démontrer une activité suppressive des T reg (T CD4⁺CD25⁺) sont très importantes à déterminer. Ainsi, si des conditions de stimulations allogéniques sont utilisées, le choix de la cellule présentatrice d'antigènes peut avoir des conséquences opposées. Deuxièmement, nos résultats décrits précédemment, montrent que les pDC matures sont capables de faire proliférer fortement les cellules T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺. Cela suggère qu'il existe un mécanisme spécifique pour ces pDC et qu'elles puissent être impliquées dans l'homéostasie des cellules T CD4⁺CD25⁺ *in vivo*. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que durant une réponse immunitaire anti-infectieuse, le rôle des pDC matures serait de permettre l'expansion des Treg qui pourraient ensuite effectuer leur fonction suppressive anti-inflammatoire dans les tissus. C'est-à-dire qu'on peut suggérer que lors d'inflammation, les pDC peuvent être recrutées dans les organes lymphoïdes (Yoneyama et al., 2004) et réguler l'activation des cellules T par modulation de l'activité suppressive des Treg. En même temps, les pDC peuvent favoriser l'expansion clonale des Treg spécifiques aux auto-antigènes qui plus tard contrôlent les réponses inflammatoires médiées par les cellules T dans les tissus durant la phase effectrice de la réponse immune. Nos résultats indiquent que l'anergie et la fonction suppressive des Treg sont différentiellement contrôlées par les sous-populations de DC et suggèrent un rôle des pDC dans le contrôle des Treg *in vivo*. Donc, La compréhension des mécanismes d'activation et éventuellement d'expansion des cellules T CD4⁺CD25⁺ par les pDC pourrait permettre d'utiliser les pDC comme cellules présentatrices d'antigène et d'expandre *ex vivo* ou *in vivo* un grand nombre de cellules T CD4⁺CD25⁺ allogéniques qui pourront être utilisées à des fins thérapeutiques chez l'homme pour l'induction de la tolérance à l'allogreffe.

Bibliographie

Abreu, M. T., Vora, P., Faure, E., Thomas, L. S., Arnold, E. T., and Arditi, M. (2001). Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 167, 1609-1616.

Akagawa, K. S., Takasuka, N., Nozaki, Y., Komuro, I., Azuma, M., Ueda, M., Naito, M., and Takahashi, K. (1996). Generation of CD1+RelB+ dendritic cells

and tartrate-resistant acid phosphatase-positive osteoclast-like multinucleated giant cells from human monocytes. *Blood* 88, 4029-4039.

Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I. L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193-197.

Akbari, O., Freeman, G. J., Meyer, E. H., Greenfield, E. A., Chang, T. T., Sharpe, A. H., Berry, G., DeKruyff, R. H., and Umetsu, D. T. (2002). Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* 8, 1024-1032.

Akiba, H., Miyahira, Y., Atsuta, M., Takeda, K., Nohara, C., Futagawa, T., Matsuda, H., Aoki, T., Yagita, H., and Okumura, K. (2000). Critical contribution of OX40 ligand to T helper cell type 2 differentiation in experimental leishmaniasis. *J Exp Med* 191, 375-380.

Akira, S. (2003). Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 15, 5-11.

Akira, S. (2006). TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 311, 1-16.

Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4, 499-511.

Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2, 675-680.

Albert, M. L., Pearce, S. F., Francisco, L. M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R. L., and Bhardwaj, N. (1998). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphaVbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 188, 1359-1368.

Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732-738.

Alyanakian, M. A., You, S., Damotte, D., Gouarin, C., Esling, A., Garcia, C., Havouis, S., Chatenoud, L., and Bach, J. F. (2003). Diversity of regulatory CD4+T cells controlling distinct organ-specific autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15806-15811.

Annunziato, F., Cosmi, L., Santarlasci, V., Maggi, L., Liotta, F., Mazzinghi, B., Parente, E., Fili, L., Ferri, S., Frosali, F., *et al.* (2007). Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 204, 1849-1861.

Ardavin, C. (1997). Thymic dendritic cells. *Immunol Today* 18, 350-361.

Ardavin, C., Martinez del Hoyo, G., Martin, P., Anjuere, F., Arias, C. F., Marin, A. R., Ruiz, S., Parrillas, V., and Hernandez, H. (2001). Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol* 22, 691-700.

Ardavin, C., Wu, L., Li, C. L., and Shortman, K. (1993). Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* 362, 761-763.

Arnold, D., Wahl, C., Faath, S., Rammensee, H. G., and Schild, H. (1997). Influences of transporter associated with antigen processing (TAP) on the repertoire of peptides associated with the endoplasmic reticulum-resident stress protein gp96. *J Exp Med* 186, 461-466.

Asselin-Paturel, C., Boonstra, A., Dalod, M., Durand, I., Yessaad, N., Dezutter-Dambuyant, C., Vicari, A., O'Garra, A., Biron, C., Briere, F., and Trinchieri, G. (2001). Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol* 2, 1144-1150.

Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L., and Powrie, F. (1999). An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 190, 995-1004.

Baccala, R., Hoebe, K., Kono, D. H., Beutler, B., and Theofilopoulos, A. N. (2007). TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity. *Nat Med* 13, 543-551.

Bacchetta, R., Gregori, S., and Roncarolo, M. G. (2005). CD4+ regulatory T cells: mechanisms of induction and effector function. *Autoimmun Rev* 4, 491-496.

Baecher-Allan, C., Brown, J. A., Freeman, G. J., and Hafler, D. A. (2001). CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 167, 1245-1253.

Baecher-Allan, C., and Hafler, D. A. (2006). Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunol Rev* 212, 203-216.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000a). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18, 767-811.

Banchereau, J., Pulendran, B., Steinman, R., and Palucka, K. (2000b). Will the making of plasmacytoid dendritic cells in vitro help unravel their mysteries? *J Exp Med* 192, F39-44.

Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.

- Bangert, C., Friedl, J., Stry, G., Stingl, G., and Kopp, T. (2003). Immunopathologic features of allergic contact dermatitis in humans: participation of plasmacytoid dendritic cells in the pathogenesis of the disease? *J Invest Dermatol* *121*, 1409-1418.
- Basu, S., Binder, R. J., Ramalingam, T., and Srivastava, P. K. (2001). CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* *14*, 303-313.
- Battaglia, M., Gregori, S., Bacchetta, R., and Roncarolo, M. G. (2006). Tr1 cells: from discovery to their clinical application. *Semin Immunol* *18*, 120-127.
- Battaglia, M., Stabilini, A., and Roncarolo, M. G. (2005). Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood* *105*, 4743-4748.
- Batten, M., Li, J., Yi, S., Kljavin, N. M., Danilenko, D. M., Lucas, S., Lee, J., de Sauvage, F. J., and Ghilardi, N. (2006). Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol* *7*, 929-936.
- Bauer, M., Redecke, V., Ellwart, J. W., Scherer, B., Kremer, J. P., Wagner, H., and Lipford, G. B. (2001). Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells. *J Immunol* *166*, 5000-5007.
- Bauer, S., and Wagner, H. (2002). Bacterial CpG-DNA licenses TLR9. *Curr Top Microbiol Immunol* *270*, 145-154.
- Bave, U., Magnusson, M., Eloranta, M. L., Perers, A., Alm, G. V., and Ronnblom, L. (2003). Fc gamma RIIa is expressed on natural IFN-alpha-producing cells (plasmacytoid dendritic cells) and is required for the IFN-alpha production induced by apoptotic cells combined with lupus IgG. *J Immunol* *171*, 3296-3302.
- Beissert, S., Schwarz, A., and Schwarz, T. (2006). Regulatory T cells. *J Invest Dermatol* *126*, 15-24.
- Bendris-Vermare, N., Barthelemy, C., Durand, I., Bruand, C., Dezutter-Dambuyant, C., Mouliau, N., Berrih-Aknin, S., Caux, C., Trinchieri, G., and Briere, F. (2001). Human thymus contains IFN-alpha-producing CD11c(-), myeloid CD11c(+), and mature interdigitating dendritic cells. *J Clin Invest* *107*, 835-844.
- Berard, F., Blanco, P., Davoust, J., Neidhart-Berard, E. M., Nouri-Shirazi, M., Taquet, N., Rimoldi, D., Cerottini, J. C., Banchereau, J., and Palucka, A. K. (2000). Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells. *J Exp Med* *192*, 1535-1544.
- Betelli, E., Korn, T., and Kuchroo, V. K. (2007). Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol*.

Bevan, M. J. (1976). Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming. *J Immunol* *117*, 2233-2238.

Bjorck, P., and Kincade, P. W. (1998). CD19+ pro-B cells can give rise to dendritic cells in vitro. *J Immunol* *161*, 5795-5799.

Blank, C., Fuchs, H., Rappersberger, K., Rollinghoff, M., and Moll, H. (1993). Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania major*. *J Infect Dis* *167*, 418-425.

Blom, B., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y. J. (2000). Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells. *J Exp Med* *192*, 1785-1796.

Blumberg, R. S. (2001). Characterization of CD1d in mucosal immune function: an immunotherapeutic target for inflammatory bowel disease. *Keio J Med* *50*, 39-44.

Bollyky, P. L., and Wilson, S. B. (2004). CD1d-restricted T-cell subsets and dendritic cell function in autoimmunity. *Immunol Cell Biol* *82*, 307-314.

Bonifaz, L. C., Bonnyay, D. P., Charalambous, A., Darguste, D. I., Fujii, S., Soares, H., Brimnes, M. K., Moltedo, B., Moran, T. M., and Steinman, R. M. (2004). In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med* *199*, 815-824.

Boonstra, A., Asselin-Paturel, C., Gilliet, M., Crain, C., Trinchieri, G., Liu, Y. J., and O'Garra, A. (2003). Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J Exp Med* *197*, 101-109.

Bourhis, L. L., and Werts, C. (2007). Role of Nods in bacterial infection. *Microbes Infect* *9*, 629-636.

Brenan, M., and Puklavec, M. (1992). The MRC OX-62 antigen: a useful marker in the purification of rat veiled cells with the biochemical properties of an integrin. *J Exp Med* *175*, 1457-1465.

Brennan, P. J., Saouaf, S. J., Greene, M. I., and Shen, Y. (2003). Anergy and suppression as coexistent mechanisms for the maintenance of peripheral T cell tolerance. *Immunol Res* *27*, 295-302.

Brinster, C., and Shevach, E. M. (2005). Bone marrow-derived dendritic cells reverse the anergic state of CD4+CD25+ T cells without reversing their suppressive function. *J Immunol* *175*, 7332-7340.

Brocker, T., Riedinger, M., and Karjalainen, K. (1997). Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med* 185, 541-550.

Brodsky, F. M., and Guagliardi, L. E. (1991). The cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol* 9, 707-744.

Brunkow, M. E., Jeffery, E. W., Hjerrild, K. A., Paepker, B., Clark, L. B., Yasayko, S. A., Wilkinson, J. E., Galas, D., Ziegler, S. F., and Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27, 68-73.

Burnet, F. M. (1960). Theories of immunity. *Perspect Biol Med* 3, 447-458.

Carreno, B. M., and Collins, M. (2002). The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol* 20, 29-53.

Caux, C., Ait-Yahia, S., Chemin, K., de Bouteiller, O., Dieu-Nosjean, M. C., Homey, B., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Zlotnik, A., and Vicari, A. (2000). Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Springer Semin Immunopathol* 22, 345-369.

Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Durand, I., Cella, M., Lanzavecchia, A., and Banchereau, J. (1997). CD34⁺ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood* 90, 1458-1470.

Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Dezutter-Dambuyant, C., de Saint-Vis, B., Jacquet, C., Yoneda, K., Imamura, S., Schmitt, D., and Banchereau, J. (1996a). CD34⁺ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med* 184, 695-706.

Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Dubois, B., de Saint Vis, B., Fayette, J., Rissoan, M. C., Briere, F., Lebecque, S., Rousset, F., *et al.* (1996b). In vitro regulation of development and function of dendritic cells. *Hematol Cell Ther* 38, 463.

Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Durand, I., and Banchereau, J. (1996c). Interleukin-3 cooperates with tumor necrosis factor alpha for the development of human dendritic/Langerhans cells from cord blood CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 87, 2376-2385.

- Cayabyab, M., Phillips, J. H., and Lanier, L. L. (1994). CD40 preferentially costimulates activation of CD4⁺ T lymphocytes. *J Immunol* 152, 1523-1531.
- Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J., and Lanzavecchia, A. (1997). Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388, 782-787.
- Cella, M., Facchetti, F., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (2000). Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol* 1, 305-310.
- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 5, 919-923.
- Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A., and Alber, G. (1996). Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 184, 747-752.
- Chan, C. W., Crafton, E., Fan, H. N., Flook, J., Yoshimura, K., Skarica, M., Brockstedt, D., Dubensky, T. W., Stins, M. F., Lanier, L. L., *et al.* (2006). Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat Med* 12, 207-213.
- Chang, C. C., Ciubotariu, R., Manavalan, J. S., Yuan, J., Colovai, A. I., Piazza, F., Lederman, S., Colonna, M., Cortesini, R., Dalla-Favera, R., and Suci-Foca, N. (2002). Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol* 3, 237-243.
- Chaperot, L., Bendriss, N., Manches, O., Gressin, R., Maynadie, M., Trimoreau, F., Orfeuvre, H., Corront, B., Feuillard, J., Sotto, J. J., *et al.* (2001). Identification of a leukemic counterpart of the plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 97, 3210-3217.
- Chapiro, J., Claverol, S., Piette, F., Ma, W., Stroobant, V., Guillaume, B., Gairin, J. E., Morel, S., Burlet-Schiltz, O., Monsarrat, B., *et al.* (2006). Destructive cleavage of antigenic peptides either by the immunoproteasome or by the standard proteasome results in differential antigen presentation. *J Immunol* 176, 1053-1061.
- Chapuis, F., Rosenzweig, M., Yagello, M., Ekman, M., Biberfeld, P., and Gluckman, J. C. (1997). Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *Eur J Immunol* 27, 431-441.
- Chatenoud, L., Salomon, B., and Bluestone, J. A. (2001). Suppressor T cells--they're back and critical for regulation of autoimmunity! *Immunol Rev* 182, 149-163.

- Chatila, T. A. (2005). Role of regulatory T cells in human diseases. *J Allergy Clin Immunol* 116, 949-959; quiz 960.
- Clark, G. J., Angel, N., Kato, M., Lopez, J. A., MacDonald, K., Vuckovic, S., and Hart, D. N. (2000). The role of dendritic cells in the innate immune system. *Microbes Infect* 2, 257-272.
- Colonna, M., Nakajima, H., and Cella, M. (2000). A family of inhibitory and activating Ig-like receptors that modulate function of lymphoid and myeloid cells. *Semin Immunol* 12, 121-127.
- Colovai, A. I., Liu, Z., Ciubotariu, R., Lederman, S., Cortesini, R., and Suciufoca, N. (2000). Induction of xenoreactive CD4+ T-cell anergy by suppressor CD8+CD28- T cells. *Transplantation* 69, 1304-1310.
- Comeau, M. R., Van der Vuurst de Vries, A. R., Maliszewski, C. R., and Galibert, L. (2002). CD123bright plasmacytoid predendritic cells: progenitors undergoing cell fate conversion? *J Immunol* 169, 75-83.
- Cornelie, S., Hoebeke, J., Schacht, A. M., Bertin, B., Vicogne, J., Capron, M., and Riveau, G. (2004). Direct evidence that toll-like receptor 9 (TLR9) functionally binds plasmid DNA by specific cytosine-phosphate-guanine motif recognition. *J Biol Chem* 279, 15124-15129.
- Cosmi, L., Liotta, F., Lazzeri, E., Francalanci, M., Angeli, R., Mazzinghi, B., Santarlaschi, V., Manetti, R., Vanini, V., Romagnani, P., *et al.* (2003). Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes. *Blood* 102, 4107-4114.
- Cottrez, F., and Groux, H. (2004). Specialization in tolerance: innate CD(4+)CD(25+) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells. *Transplantation* 77, S12-15.
- Crane, I. J., and Forrester, J. V. (2005). Th1 and Th2 lymphocytes in autoimmune disease. *Crit Rev Immunol* 25, 75-102.
- Creusot, R. J., Mitchison, N. A., and Terazzini, N. M. (2002). The immunological synapse. *Mol Immunol* 38, 997-1002.
- Cua, D. J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C. A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., *et al.* (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421, 744-748.
- da Silva Correia, J., Soldau, K., Christen, U., Tobias, P. S., and Ulevitch, R. J. (2001). Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J Biol Chem* 276, 21129-21135.

Dakic, A., Shao, Q. X., D'Amico, A., O'Keeffe, M., Chen, W. F., Shortman, K., and Wu, L. (2004). Development of the dendritic cell system during mouse ontogeny. *J Immunol* *172*, 1018-1027.

Darrasse-Jeze, G., Marodon, G., Salomon, B. L., Catala, M., and Klatzmann, D. (2005). Ontogeny of CD4+CD25+ regulatory/suppressor T cells in human fetuses. *Blood* *105*, 4715-4721.

de Baey, A., and Lanzavecchia, A. (2000). The role of aquaporins in dendritic cell macropinocytosis. *J Exp Med* *191*, 743-748.

de Heer, H. J., Hammad, H., Soullie, T., Hijdra, D., Vos, N., Willart, M. A., Hoogsteden, H. C., and Lambrecht, B. N. (2004). Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J Exp Med* *200*, 89-98.

de Jong, E. C., Smits, H. H., and Kapsenberg, M. L. (2005). Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin Immunopathol* *26*, 289-307.

de Jong, E. C., Vieira, P. L., Kalinski, P., Schuitemaker, J. H., Tanaka, Y., Wierenga, E. A., Yazdanbakhsh, M., and Kapsenberg, M. L. (2002). Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals. *J Immunol* *168*, 1704-1709.

De Wit, D., Olislagers, V., Goriely, S., Vermeulen, F., Wagner, H., Goldman, M., and Willems, F. (2004). Blood plasmacytoid dendritic cell responses to CpG oligodeoxynucleotides are impaired in human newborns. *Blood* *103*, 1030-1032.

del Hoyo, G. M., Martin, P., Vargas, H. H., Ruiz, S., Arias, C. F., and Ardavin, C. (2002). Characterization of a common precursor population for dendritic cells. *Nature* *415*, 1043-1047.

Delneste, Y., Magistrelli, G., Gauchat, J., Haeuw, J., Aubry, J., Nakamura, K., Kawakami-Honda, N., Goetsch, L., Sawamura, T., Bonnefoy, J., and Jeannin, P. (2002). Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity* *17*, 353-362.

den Haan, J. M., and Bevan, M. J. (2002). Constitutive versus activation-dependent cross-presentation of immune complexes by CD8(+) and CD8(-) dendritic cells in vivo. *J Exp Med* *196*, 817-827.

Dhodapkar, M. V., and Steinman, R. M. (2002). Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8(+) regulatory T cells in vivo in humans. *Blood* *100*, 174-177.

Dhodapkar, M. V., Steinman, R. M., Krasovsky, J., Munz, C., and Bhardwaj, N. (2001). Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* *193*, 233-238.

- Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., and Reis e Sousa, C. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303, 1529-1531.
- Diebold, S. S., Montoya, M., Unger, H., Alexopoulou, L., Roy, P., Haswell, L. E., Al-Shamkhani, A., Flavell, R., Borrow, P., and Reis e Sousa, C. (2003). Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers. *Nature* 424, 324-328.
- Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T., and Schuler, G. (2001). Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 193, 1303-1310.
- Dieu, M. C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J. M., Oldham, E., Ait-Yahia, S., Briere, F., Zlotnik, A., Lebecque, S., and Caux, C. (1998). Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 188, 373-386.
- Dorado, B., Jerez, M. J., Flores, N., Martin-Saavedra, F. M., Duran, C., and Ballester, S. (2002). Autocrine IL-4 gene regulation at late phases of TCR activation in differentiated Th2 cells. *J Immunol* 169, 3030-3037.
- Dunne, A., and O'Neill, L. A. (2003). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* 2003, re3.
- Dunzendorfer, S., Lee, H. K., Soldau, K., and Tobias, P. S. (2004). TLR4 is the signaling but not the lipopolysaccharide uptake receptor. *J Immunol* 173, 1166-1170.
- Durkin, H. G., and Waksman, B. H. (2001). Thymus and tolerance. Is regulation the major function of the thymus? *Immunol Rev* 182, 33-57.
- Dzionic, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D. W., and Schmitz, J. (2000). BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 165, 6037-6046.
- Dzionic, A., Inagaki, Y., Okawa, K., Nagafune, J., Rock, J., Sohma, Y., Winkels, G., Zysk, M., Yamaguchi, Y., and Schmitz, J. (2002). Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Hum Immunol* 63, 1133-1148.
- Dzionic, A., Sohma, Y., Nagafune, J., Cella, M., Colonna, M., Facchetti, F., Gunther, G., Johnston, I., Lanzavecchia, A., Nagasaka, T., *et al.* (2001). BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med* 194, 1823-1834.

Ekkens, M. J., Liu, Z., Liu, Q., Whitmire, J., Xiao, S., Foster, A., Pesce, J., VanNoy, J., Sharpe, A. H., Urban, J. F., and Gause, W. C. (2003). The role of OX40 ligand interactions in the development of the Th2 response to the gastrointestinal nematode parasite *Heligmosomoides polygyrus*. *J Immunol* *170*, 384-393.

Elzey, B. D., Tian, J., Jensen, R. J., Swanson, A. K., Lees, J. R., Lentz, S. R., Stein, C. S., Nieswandt, B., Wang, Y., Davidson, B. L., and Ratliff, T. L. (2003). Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments. *Immunity* *19*, 9-19.

Engering, A., Geijtenbeek, T. B., van Vliet, S. J., Wijers, M., van Liempt, E., Demaurex, N., Lanzavecchia, A., Fransen, J., Figdor, C. G., Piguet, V., and van Kooyk, Y. (2002). The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol* *168*, 2118-2126.

Enk, A. H. (2005). Dendritic cells in tolerance induction. *Immunol Lett* *99*, 8-11.

Ermann, J., Hoffmann, P., Edinger, M., Dutt, S., Blankenberg, F. G., Higgins, J. P., Negrin, R. S., Fathman, C. G., and Strober, S. (2005). Only the CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood* *105*, 2220-2226.

Facchetti, F., Boden, G., De Wolf-Peeters, C., Vandaele, R., Degreef, H., and Desmet, V. J. (1990). Plasmacytoid monocytes in Jessner's lymphocytic infiltration of the skin. *Am J Dermatopathol* *12*, 363-369.

Facchetti, F., De Wolf-Peeters, C., De Vos, R., van den Oord, J. J., Pulford, K. A., and Desmet, V. J. (1989a). Plasmacytoid monocytes (so-called plasmacytoid T cells) in granulomatous lymphadenitis. *Hum Pathol* *20*, 588-593.

Facchetti, F., de Wolf-Peeters, C., Mason, D. Y., Pulford, K., van den Oord, J. J., and Desmet, V. J. (1988a). Plasmacytoid T cells. Immunohistochemical evidence for their monocyte/macrophage origin. *Am J Pathol* *133*, 15-21.

Facchetti, F., De Wolf-Peeters, C., van den Oord, J. J., De vos, R., and Desmet, V. J. (1988b). Plasmacytoid T cells: a cell population normally present in the reactive lymph node. An immunohistochemical and electronmicroscopic study. *Hum Pathol* *19*, 1085-1092.

Facchetti, F., de Wolf-Peeters, C., van den Oord, J. J., de Vos, R., and Desmet, V. J. (1989b). Plasmacytoid monocytes (so-called plasmacytoid T-cells) in

Kikuchi's lymphadenitis. An immunohistologic study. *Am J Clin Pathol* 92, 42-50.

Facchetti, F., De Wolf-Peters, C., Marocolo, D., and De Vos, R. (1991). Plasmacytoid monocytes in granulomatous lymphadenitis and in histiocytic necrotizing lymphadenitis. *Sarcoidosis* 8, 170-171.

Falb, D., Briner, T. J., Sunshine, G. H., Bourque, C. R., Luqman, M., Gefter, M. L., and Kamradt, T. (1996). Peripheral tolerance in T cell receptor-transgenic mice: evidence for T cell anergy. *Eur J Immunol* 26, 130-135.

Fanger, N. A., Wardwell, K., Shen, L., Tedder, T. F., and Guyre, P. M. (1996). Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J Immunol* 157, 541-548.

Faria, A. M., and Weiner, H. L. (2005). Oral tolerance. *Immunol Rev* 206, 232-259.

Ferber, I., Schonrich, G., Schenkel, J., Mellor, A. L., Hammerling, G. J., and Arnold, B. (1994). Levels of peripheral T cell tolerance induced by different doses of tolerogen. *Science* 263, 674-676.

Ferrero, I., Held, W., Wilson, A., Tacchini-Cottier, F., Radtke, F., and MacDonald, H. R. (2002). Mouse CD11c(+) B220(+) Gr1(+) plasmacytoid dendritic cells develop independently of the T-cell lineage. *Blood* 100, 2852-2857.

Fischer, K., Voelkl, S., Heymann, J., Przybylski, G. K., Mondal, K., Laumer, M., Kunz-Schughart, L., Schmidt, C. A., Andreesen, R., and Mackensen, A. (2005). Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood* 105, 2828-2835.

Fisson, S., Darrasse-Jeze, G., Litvinova, E., Septier, F., Klatzmann, D., Liblau, R., and Salomon, B. L. (2003). Continuous activation of autoreactive CD4+ CD25+ regulatory T cells in the steady state. *J Exp Med* 198, 737-746.

Fitzgerald-Bocarsly, P. (1993). Human natural interferon-alpha producing cells. *Pharmacol Ther* 60, 39-62.

Fonteneau, J. F., Gilliet, M., Larsson, M., Dasilva, I., Munz, C., Liu, Y. J., and Bhardwaj, N. (2003). Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood* 101, 3520-3526.

Fontenot, J. D., Gavin, M. A., and Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4, 330-336.

Fontenot, J. D., and Rudensky, A. Y. (2005). A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* 6, 331-337.

Foronczewicz, B., Mucha, K., and Paczek, L. (2002). [The role of T helper lymphocytes population: Th1, Th2, and Th3 in human immune response]. *Pol Arch Med Wewn* 108, 893-899.

Forster, I., and Lieberam, I. (1996). Peripheral tolerance of CD4 T cells following local activation in adolescent mice. *Eur J Immunol* 26, 3194-3202.

Fowell, D., and Mason, D. (1993). Evidence that the T cell repertoire of normal rats contains cells with the potential to cause diabetes. Characterization of the CD4+ T cell subset that inhibits this autoimmune potential. *J Exp Med* 177, 627-636.

Friedl, P., den Boer, A. T., and Gunzer, M. (2005). Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 5, 532-545.

Fu, S., Yopp, A. C., Mao, X., Chen, D., Zhang, N., Chen, D., Mao, M., Ding, Y., and Bromberg, J. S. (2004). CD4+ CD25+ CD62+ T-regulatory cell subset has optimal suppressive and proliferative potential. *Am J Transplant* 4, 65-78.

Galy, A., Christopherson, I., Ferlazzo, G., Liu, G., Spits, H., and Georgopoulos, K. (2000). Distinct signals control the hematopoiesis of lymphoid-related dendritic cells. *Blood* 95, 128-137.

Galy, A., Travis, M., Cen, D., and Chen, B. (1995). Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* 3, 459-473.

Garba, M. L., Pilcher, C. D., Bingham, A. L., Eron, J., and Frelinger, J. A. (2002). HIV antigens can induce TGF-beta(1)-producing immunoregulatory CD8+ T cells. *J Immunol* 168, 2247-2254.

Gavin, M. A., Clarke, S. R., Negrou, E., Gallegos, A., and Rudensky, A. (2002). Homeostasis and anergy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol* 3, 33-41.

Gay, N. J., and Keith, F. J. (1991). Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* 351, 355-356.

Geijtenbeek, T. B., Kwon, D. S., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Middel, J., Cornelissen, I. L., Nottet, H. S., KewalRamani, V. N., Littman, D. R., *et al.* (2000). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100, 587-597.

Germain, R. N., Braunstein, N. S., Brown, M. A., Glimcher, L. H., Lechler, R. I., McCluskey, J., Margulies, D. H., Miller, J., Norcross, M. A., Paul, W. E., and et al. (1986). Structure and function of murine class II major histocompatibility complex genes. *Mt Sinai J Med* 53, 194-201.

Germain, R. N., and Margulies, D. H. (1993). The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol* 11, 403-450.
Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G., and Trinchieri, G. (2002). Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 195, 327-333.

Ghiringhelli, F., Larmonier, N., Schmitt, E., Parcellier, A., Cathelin, D., Garrido, C., Chauffert, B., Solary, E., Bonnotte, B., and Martin, F. (2004). CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol* 34, 336-344.

Ghiringhelli, F., Puig, P. E., Roux, S., Parcellier, A., Schmitt, E., Solary, E., Kroemer, G., Martin, F., Chauffert, B., and Zitvogel, L. (2005). Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med* 202, 919-929.

Gillessen, S., Naumov, Y. N., Nieuwenhuis, E. E., Exley, M. A., Lee, F. S., Mach, N., Luster, A. D., Blumberg, R. S., Taniguchi, M., Balk, S. P., et al. (2003). CD1d-restricted T cells regulate dendritic cell function and antitumor immunity in a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent fashion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8874-8879.

Gilliet, M., Boonstra, A., Paturel, C., Antonenko, S., Xu, X. L., Trinchieri, G., O'Garra, A., and Liu, Y. J. (2002). The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 195, 953-958.

Gilliet, M., and Liu, Y. J. (2002a). Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 195, 695-704.

Gilliet, M., and Liu, Y. J. (2002b). Human plasmacytoid-derived dendritic cells and the induction of T-regulatory cells. *Hum Immunol* 63, 1149-1155.

Girard, J. P., and Springer, T. A. (1995). High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol Today* 16, 449-457.

Godfrey, W. R., Ge, Y. G., Spoden, D. J., Levine, B. L., June, C. H., Blazar, B. R., and Porter, S. B. (2004). In vitro-expanded human CD4(+)CD25(+) T-regulatory cells can markedly inhibit allogeneic dendritic cell-stimulated MLR cultures. *Blood* 104, 453-461.

Godfrey, W. R., Spoden, D. J., Ge, Y. G., Baker, S. R., Liu, B., Levine, B. L., June, C. H., Blazar, B. R., and Porter, S. B. (2005). Cord blood CD4(+)CD25(+)-

derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function. *Blood* 105, 750-758.

Green, E. A., Choi, Y., and Flavell, R. A. (2002). Pancreatic lymph node-derived CD4(+)CD25(+) Treg cells: highly potent regulators of diabetes that require TRANCE-RANK signals. *Immunity* 16, 183-191.

Grewal, I. S., and Flavell, R. A. (1996). A central role of CD40 ligand in the regulation of CD4+ T-cell responses. *Immunol Today* 17, 410-414.

Gromme, M., Uytdehaag, F. G., Janssen, H., Calafat, J., van Binnendijk, R. S., Kenter, M. J., Tulp, A., Verwoerd, D., and Neefjes, J. (1999). Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10326-10331.

Grouard, G., Risoan, M. C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J., and Liu, Y. J. (1997). The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 185, 1101-1111.

Groux, H. (2003). Type 1 T-regulatory cells: their role in the control of immune responses. *Transplantation* 75, 8S-12S.

Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J. E., and Roncarolo, M. G. (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737-742.

Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., and Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20, 621-667.

Guillonnet, C., Hill, M., Hubert, F. X., Chiffolleau, E., Herve, C., Li, X. L., Heslan, M., Usal, C., Tesson, L., Menoret, S., *et al.* (2007). CD40lg treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 117, 1096-1106.

Gunn, M. D., Tangemann, K., Tam, C., Cyster, J. G., Rosen, S. D., and Williams, L. T. (1998). A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 258-263.

Hacker, H., Mischak, H., Miethke, T., Liptay, S., Schmid, R., Sparwasser, T., Heeg, K., Lipford, G. B., and Wagner, H. (1998). CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *Embo J* 17, 6230-6240.

- Hammond, K. J., Poulton, L. D., Palmisano, L. J., Silveira, P. A., Godfrey, D. I., and Baxter, A. G. (1998). alpha/beta-T cell receptor (TCR)+CD4-CD8- (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10. *J Exp Med* *187*, 1047-1056.
- Hanabuchi, S., Watanabe, N., Wang, Y. H., Wang, Y. H., Ito, T., Shaw, J., Cao, W., Qin, F. X., and Liu, Y. J. (2006). Human plasmacytoid dendritic cells activate NK cells through glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-ligand (GITRL). *Blood* *107*, 3617-3623.
- Hara, M., Kingsley, C. I., Niimi, M., Read, S., Turvey, S. E., Bushell, A. R., Morris, P. J., Powrie, F., and Wood, K. J. (2001). IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *J Immunol* *166*, 3789-3796.
- Hartmann, E., Wollenberg, B., Rothenfusser, S., Wagner, M., Wellisch, D., Mack, B., Giese, T., Gires, O., Endres, S., and Hartmann, G. (2003). Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res* *63*, 6478-6487.
- Hasan, U., Chaffois, C., Gaillard, C., Saulnier, V., Merck, E., Tancredi, S., Guiet, C., Briere, F., Vlach, J., Lebecque, S., *et al.* (2005). Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol* *174*, 2942-2950.
- Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., and Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* *410*, 1099-1103.
- Heath, W. R., and Carbone, F. R. (2001). Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* *19*, 47-64.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* *303*, 1526-1529.
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K., and Akira, S. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* *3*, 196-200.
- Henri, S., Vremec, D., Kamath, A., Waithman, J., Williams, S., Benoist, C., Burnham, K., Saeland, S., Handman, E., and Shortman, K. (2001). The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *J Immunol* *167*, 741-748.
- Hochrein, H., O'Keeffe, M., and Wagner, H. (2002). Human and mouse plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol* *63*, 1103-1110.

Hoffmann, J. A., Reichhart, J. M., and Hetru, C. (1996). Innate immunity in higher insects. *Curr Opin Immunol* 8, 8-13.

Hoffmann, P., Eder, R., Kunz-Schughart, L. A., Andreesen, R., and Edinger, M. (2004). Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4(+)CD25high regulatory T cells. *Blood* 104, 895-903.

Homann, D., Jahreis, A., Wolfe, T., Hughes, A., Coon, B., van Stipdonk, M. J., Prilliman, K. R., Schoenberger, S. P., and von Herrath, M. G. (2002). CD40L blockade prevents autoimmune diabetes by induction of bitypic NK/DC regulatory cells. *Immunity* 16, 403-415.

Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N., and Taniguchi, T. (2005). IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434, 772-777.

Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G. (2002). Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 168, 4531-4537.

Horny, H. P., and Horst, H. A. (1986). Lymphoreticular infiltrates in invasive ductal breast cancer. A histological and immunohistological study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 409, 275-286.

Hosken, N. A., Shibuya, K., Heath, A. W., Murphy, K. M., and O'Garra, A. (1995). The effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model. *J Exp Med* 182, 1579-1584.

Huang, F. P., Platt, N., Wykes, M., Major, J. R., Powell, T. J., Jenkins, C. D., and MacPherson, G. G. (2000). A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J Exp Med* 191, 435-444.

Huber, S., Schramm, C., Lehr, H. A., Mann, A., Schmitt, S., Becker, C., Protschka, M., Galle, P. R., Neurath, M. F., and Blessing, M. (2004). Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. *J Immunol* 173, 6526-6531.

Hubert, F. X., Voisine, C., Louvet, C., Heslan, J. M., Ouabed, A., Heslan, M., and Josien, R. (2006). Differential pattern recognition receptor expression but stereotyped responsiveness in rat spleen dendritic cell subsets. *J Immunol* 177, 1007-1016.

Hubert, F. X., Voisine, C., Louvet, C., Heslan, M., and Josien, R. (2004). Rat plasmacytoid dendritic cells are an abundant subset of MHC class II+ CD4+CD11b-OX62- and type I IFN-producing cells that exhibit selective expression of Toll-like receptors 7 and 9 and strong responsiveness to CpG. *J Immunol* *172*, 7485-7494.

Hunter, C. A., and Reiner, S. L. (2000). Cytokines and T cells in host defense. *Curr Opin Immunol* *12*, 413-418.

Inaba, K., Inaba, M., Naito, M., and Steinman, R. M. (1993). Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp Med* *178*, 479-488.

Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S., and Steinman, R. M. (1992). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* *176*, 1693-1702.

Inaba, K., Witmer-Pack, M., Inaba, M., Hathcock, K. S., Sakuta, H., Azuma, M., Yagita, H., Okumura, K., Linsley, P. S., Ikehara, S., *et al.* (1994). The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J Exp Med* *180*, 1849-1860.

Inobe, J., Slavin, A. J., Komagata, Y., Chen, Y., Liu, L., and Weiner, H. L. (1998). IL-4 is a differentiation factor for transforming growth factor-beta secreting Th3 cells and oral administration of IL-4 enhances oral tolerance in experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol* *28*, 2780-2790.

Inohara, Chamaillard, McDonald, C., and Nunez, G. (2005). NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem* *74*, 355-383.

Ishii, N., Ndhlovu, L. C., Murata, K., Sato, T., Kamanaka, M., and Sugamura, K. (2003). OX40 (CD134) and OX40 ligand interaction plays an adjuvant role during in vivo Th2 responses. *Eur J Immunol* *33*, 2372-2381.

Ito, T., Yang, M., Wang, Y. H., Lande, R., Gregorio, J., Perng, O. A., Qin, X. F., Liu, Y. J., and Gilliet, M. (2007). Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med* *204*, 105-115.

Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F., and Sakaguchi, S. (1999). Thymus and autoimmunity: production of

CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 162, 5317-5326.

Jahnsen, F. L., Farkas, L., Lund-Johansen, F., and Brandtzaeg, P. (2002). Involvement of plasmacytoid dendritic cells in human diseases. *Hum Immunol* 63, 1201-1205.

Janeway, C. (1989). Immunogenicity signals 1,2,3. and 0. *Immunol Today* 10, 283-286.

Jarrossay, D., Napolitani, G., Colonna, M., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2001). Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 31, 3388-3393.

Jeannin, P., Renno, T., Goetsch, L., Miconnet, I., Aubry, J. P., Delneste, Y., Herbault, N., Baussant, T., Magistrelli, G., Soulas, C., *et al.* (2000). OmpA targets dendritic cells, induces their maturation and delivers antigen into the MHC class I presentation pathway. *Nat Immunol* 1, 502-509.

Jego, G., Palucka, A. K., Blanck, J. P., Chalouni, C., Pascual, V., and Banchereau, J. (2003). Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* 19, 225-234.

Jiang, S., and Lechler, R. I. (2003). Regulatory T cells in the control of transplantation tolerance and autoimmunity. *Am J Transplant* 3, 516-524.

Jones, R. A., Child, J. A., Master, P. S., and Scott, C. S. (1991). The MHC class I associated beta 2-microglobulin (beta 2m) light chain is expressed in a molar excess over HLA-ABC and CD1 on the membrane of leukaemic B cells but not leukaemic T cells: evidence for further beta 2m-associated molecules. *Scand J Immunol* 34, 53-61.

Jonuleit, H., and Schmitt, E. (2003). The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol* 171, 6323-6327.

Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J., and Enk, A. H. (2000). Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 192, 1213-1222.

Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J., and Enk, A. H. (2001). Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 193, 1285-1294.

Jordan, M. S., Boesteanu, A., Reed, A. J., Petrone, A. L., Hohenbeck, A. E., Lerman, M. A., Naji, A., and Caton, A. J. (2001). Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2, 301-306.

Jurk, M., Heil, F., Vollmer, J., Schetter, C., Krieg, A. M., Wagner, H., Lipford, G., and Bauer, S. (2002). Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* 3, 499.

Kadowaki, N., Antonenko, S., Lau, J. Y., and Liu, Y. J. (2000). Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 192, 219-226.

Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R. W., Kastelein, R. A., Bazan, F., and Liu, Y. J. (2001). Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 194, 863-869.

Kaisho, T., Takeuchi, O., Kawai, T., Hoshino, K., and Akira, S. (2001). Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J Immunol* 166, 5688-5694.

Kalinski, P., Hilkens, C. M., Wierenga, E. A., and Kapsenberg, M. L. (1999). T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 20, 561-567.

Kamath, A. T., Pooley, J., O'Keeffe, M. A., Vremec, D., Zhan, Y., Lew, A. M., D'Amico, A., Wu, L., Tough, D. F., and Shortman, K. (2000). The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations. *J Immunol* 165, 6762-6770.

Kamogawa-Schifter, Y., Ohkawa, J., Namiki, S., Arai, N., Arai, K., and Liu, Y. (2005). Ly49Q defines 2 pDC subsets in mice. *Blood* 105, 2787-2792.

Kamradt, T., and Mitchison, N. A. (2001). Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med* 344, 655-664.

Kaneider, N. C., Kaser, A., Tilg, H., Ricevuti, G., and Wiedermann, C. J. (2003). CD40 ligand-dependent maturation of human monocyte-derived dendritic cells by activated platelets. *Int J Immunopathol Pharmacol* 16, 225-231.

Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 11, 115-122.

Kawai, T., Takeuchi, O., Fujita, T., Inoue, J., Muhlradt, P. F., Sato, S., Hoshino, K., and Akira, S. (2001). Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent

pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* **167**, 5887-5894.

Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Motoki, K., Ueno, H., Nakagawa, R., Sato, H., Kondo, E., *et al.* (1997). CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* **278**, 1626-1629.

Kerkmann, M., Rothenfusser, S., Hornung, V., Towarowski, A., Wagner, M., Sarris, A., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G. (2003). Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* **170**, 4465-4474.

Kiertscher, S. M., and Roth, M. D. (1996). Human CD14⁺ leukocytes acquire the phenotype and function of antigen-presenting dendritic cells when cultured in GM-CSF and IL-4. *J Leukoc Biol* **59**, 208-218.

Kim, J. M., and Rudensky, A. (2006). The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells. *Immunol Rev* **212**, 86-98.

Kingsley, C. I., Karim, M., Bushell, A. R., and Wood, K. J. (2002). CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol* **168**, 1080-1086.

Kobayashi, T., Walsh, M. C., and Choi, Y. (2004). The role of TRAF6 in signal transduction and the immune response. *Microbes Infect* **6**, 1333-1338.

Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K., and Iwakura, Y. (2006). IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **177**, 566-573.

Kovacsovics-Bankowski, M., and Rock, K. L. (1995). A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* **267**, 243-246.

Krug, A., Rothenfusser, S., Hornung, V., Jahrsdorfer, B., Blackwell, S., Ballas, Z. K., Endres, S., Krieg, A. M., and Hartmann, G. (2001a). Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* **31**, 2154-2163.

Krug, A., Towarowski, A., Britsch, S., Rothenfusser, S., Hornung, V., Bals, R., Giese, T., Engelmann, H., Endres, S., Krieg, A. M., and Hartmann, G. (2001b). Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* **31**, 3026-3037.

Kumanogoh, A., Wang, X., Lee, I., Watanabe, C., Kamanaka, M., Shi, W., Yoshida, K., Sato, T., Habu, S., Itoh, M., *et al.* (2001). Increased T cell

autoreactivity in the absence of CD40-CD40 ligand interactions: a role of CD40 in regulatory T cell development. *J Immunol* 166, 353-360.

Kurt-Jones, E. A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L. M., Jones, L. P., Tripp, R. A., Walsh, E. E., Freeman, M. W., Golenbock, D. T., Anderson, L. J., and Finberg, R. W. (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 1, 398-401.

Kurts, C., Heath, W. R., Carbone, F. R., Allison, J., Miller, J. F., and Kosaka, H. (1996). Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J Exp Med* 184, 923-930.

Kurts, C., Sutherland, R. M., Davey, G., Li, M., Lew, A. M., Blanas, E., Carbone, F. R., Miller, J. F., and Heath, W. R. (1999). CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12703-12707.

Kuwana, M., Kaburaki, J., Wright, T. M., Kawakami, Y., and Ikeda, Y. (2001). Induction of antigen-specific human CD4(+) T cell anergy by peripheral blood DC2 precursors. *Eur J Immunol* 31, 2547-2557.

Laing, K. J., and Secombes, C. J. (2004). Chemokines. *Dev Comp Immunol* 28, 443-460.

Langenkamp, A., Casorati, G., Garavaglia, C., Dellabona, P., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2002). T cell priming by dendritic cells: thresholds for proliferation, differentiation and death and intraclonal functional diversification. *Eur J Immunol* 32, 2046-2054.

Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2000). Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol* 1, 311-316.

Lanzavecchia, A. (1998). From antigen presentation to T-cell activation. *Res Immunol* 149, 626.

- Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2001). The instructive role of dendritic cells on T cell responses: lineages, plasticity and kinetics. *Curr Opin Immunol* 13, 291-298.
- Lauw, F. N., Caffrey, D. R., and Golenbock, D. T. (2005). Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin. *Trends Immunol* 26, 509-511.
- Lawton, A. P., Prigozy, T. I., Brossay, L., Pei, B., Khurana, A., Martin, D., Zhu, T., Spate, K., Ozga, M., Honing, S., *et al.* (2005). The mouse CD1d cytoplasmic tail mediates CD1d trafficking and antigen presentation by adaptor protein 3-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol* 174, 3179-3186.
- Lebre, M. C., Antons, J. C., Kalinski, P., Schuitemaker, J. H., van Capel, T. M., Kapsenberg, M. L., and De Jong, E. C. (2003). Double-stranded RNA-exposed human keratinocytes promote Th1 responses by inducing a Type-1 polarized phenotype in dendritic cells: role of keratinocyte-derived tumor necrosis factor alpha, type I interferons, and interleukin-18. *J Invest Dermatol* 120, 990-997.
- Lee, K. M., Chuang, E., Griffin, M., Khattri, R., Hong, D. K., Zhang, W., Straus, D., Samelson, L. E., Thompson, C. B., and Bluestone, J. A. (1998). Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science* 282, 2263-2266.
- Lehmann, J., Huehn, J., de la Rosa, M., Maszyra, F., Kretschmer, U., Krenn, V., Brunner, M., Scheffold, A., and Hamann, A. (2002). Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25-regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13031-13036.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973-983.
- Lennert, K. (1958). [Early changes of lymphogranulomatosis.]. *Frankf Z Pathol* 69, 103-122.
- Lennert, K., Kaiserling, E., and Muller-Hermelink, H. K. (1975). Letter: T-associated plasma-cells. *Lancet* 1, 1031-1032.
- Levings, M. K., Gregori, S., Tresoldi, E., Cazzaniga, S., Bonini, C., and Roncarolo, M. G. (2005). Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood* 105, 1162-1169.
- Levings, M. K., Sangregorio, R., Galbiati, F., Squadrone, S., de Waal Malefyt, R., and Roncarolo, M. G. (2001). IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J Immunol* 166, 5530-5539.
- Lewinsohn, D. M., Bargatze, R. F., and Butcher, E. C. (1987). Leukocyte-endothelial cell recognition: evidence of a common molecular mechanism shared by neutrophils, lymphocytes, and other leukocytes. *J Immunol* 138, 4313-4321.

- Li, M., Davey, G. M., Sutherland, R. M., Kurts, C., Lew, A. M., Hirst, C., Carbone, F. R., and Heath, W. R. (2001). Cell-associated ovalbumin is cross-presented much more efficiently than soluble ovalbumin in vivo. *J Immunol* *166*, 6099-6103.
- Liu, K., Waskow, C., Liu, X., Yao, K., Hoh, J., and Nussenzweig, M. (2007). Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice. *Nat Immunol* *8*, 578-583.
- Liu, Y. J., Kanzler, H., Soumelis, V., and Gilliet, M. (2001). Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat Immunol* *2*, 585-589.
- Liu, Z. J., Liu, C. A., and Gong, J. P. (2005). [IRAK-4: the key molecule of TLR/IL-1R common signal transduction system]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* *36*, 276-279.
- Lu, P., Zhou, X., Chen, S. J., Moorman, M., Morris, S. C., Finkelman, F. D., Linsley, P., Urban, J. F., and Gause, W. C. (1994). CTLA-4 ligands are required to induce an in vivo interleukin 4 response to a gastrointestinal nematode parasite. *J Exp Med* *180*, 693-698.
- Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R., and Iwasaki, A. (2003). Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* *198*, 513-520.
- Lund, J. M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N. C., Gale, N. W., Iwasaki, A., and Flavell, R. A. (2004). Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 5598-5603.
- Lyddane, C., Gajewska, B. U., Santos, E., King, P. D., Furtado, G. C., and Sadelain, M. (2006). Cutting Edge: CD28 controls dominant regulatory T cell activity during active immunization. *J Immunol* *176*, 3306-3310.
- MacDonald, A. S., and Pearce, E. J. (2002). Cutting edge: polarized Th cell response induction by transferred antigen-pulsed dendritic cells is dependent on IL-4 or IL-12 production by recipient cells. *J Immunol* *168*, 3127-3130.
- Macian, F., Im, S. H., Garcia-Cozar, F. J., and Rao, A. (2004). T-cell anergy. *Curr Opin Immunol* *16*, 209-216.
- MacPherson, G. G., Jenkins, C. D., Stein, M. J., and Edwards, C. (1995). Endotoxin-mediated dendritic cell release from the intestine. Characterization of released dendritic cells and TNF dependence. *J Immunol* *154*, 1317-1322.
- Mahnke, K., and Enk, A. H. (2005). Dendritic cells: key cells for the induction of regulatory T cells? *Curr Top Microbiol Immunol* *293*, 133-150.

Mahnke, K., Schmitt, E., Bonifaz, L., Enk, A. H., and Jonuleit, H. (2002). Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 80, 477-483.

Maki, K., Sunaga, S., Komagata, Y., Kodaira, Y., Mabuchi, A., Karasuyama, H., Yokomuro, K., Miyazaki, J. I., and Ikuta, K. (1996). Interleukin 7 receptor-deficient mice lack gammadelta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7172-7177.

Makita, S., Kanai, T., Oshima, S., Uraushihara, K., Totsuka, T., Sawada, T., Nakamura, T., Koganei, K., Fukushima, T., and Watanabe, M. (2004). CD4⁺CD25^{bright} T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells. *J Immunol* 173, 3119-3130.

Maldonado-Lopez, R., De Smedt, T., Michel, P., Godfroid, J., Pajak, B., Heirman, C., Thielemans, K., Leo, O., Urbain, J., and Moser, M. (1999). CD8alpha⁺ and CD8alpha⁻ subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med* 189, 587-592.

Maloy, K. J., and Powrie, F. (2001). Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2, 816-822.

Manavalan, J. S., Kim-Schulze, S., Scotto, L., Naiyer, A. J., Vlad, G., Colombo, P. C., Marboe, C., Mancini, D., Cortesini, R., and Suci-Foca, N. (2004). Alloantigen specific CD8⁺CD28⁻ FOXP3⁺ T suppressor cells induce ILT3⁺ ILT4⁺ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. *Int Immunol* 16, 1055-1068.

Marie, J. C., Letterio, J. J., Gavin, M., and Rudensky, A. Y. (2005). TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Exp Med* 201, 1061-1067.

Marquez, C., Trigueros, C., Franco, J. M., Ramiro, A. R., Carrasco, Y. R., Lopez-Botet, M., and Toribio, M. L. (1998). Identification of a common developmental pathway for thymic natural killer cells and dendritic cells. *Blood* 91, 2760-2771.

Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12, 991-1045.

Mazzoni, A., and Segal, D. M. (2004). Controlling the Toll road to dendritic cell polarization. *J Leukoc Biol* 75, 721-730.

- McCurdy, J. D., Lin, T. J., and Marshall, J. S. (2001). Toll-like receptor 4-mediated activation of murine mast cells. *J Leukoc Biol* *70*, 977-984.
- McHugh, R. S., Whitters, M. J., Piccirillo, C. A., Young, D. A., Shevach, E. M., Collins, M., and Byrne, M. C. (2002). CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* *16*, 311-323.
- Means, T. K., Hayashi, F., Smith, K. D., Aderem, A., and Luster, A. D. (2003). The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells. *J Immunol* *170*, 5165-5175.
- Means, T. K., Wang, S., Lien, E., Yoshimura, A., Golenbock, D. T., and Fenton, M. J. (1999). Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* *163*, 3920-3927.
- Medzhitov, R. (2001). CpG DNA: security code for host defense. *Nat Immunol* *2*, 15-16.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C. A., Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* *388*, 394-397.
- Miller, J., Daitch, L., Rath, S., and Selsing, E. (1990). Tissue-specific expression of allogeneic class II MHC molecules induces neither tissue rejection nor clonal inactivation of alloreactive T cells. *J Immunol* *144*, 334-341.
- Mills, K. H., and McGuirk, P. (2004). Antigen-specific regulatory T cells--their induction and role in infection. *Semin Immunol* *16*, 107-117.
- Moseman, E. A., Liang, X., Dawson, A. J., Panoskaltsis-Mortari, A., Krieg, A. M., Liu, Y. J., Blazar, B. R., and Chen, W. (2004). Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* *173*, 4433-4442.
- Mowat, A. M., Parker, L. A., Beacock-Sharp, H., Millington, O. R., and Chirdo, F. (2004). Oral tolerance: overview and historical perspectives. *Ann N Y Acad Sci* *1029*, 1-8.
- Mucida, D., Park, Y., Kim, G., Turovskaya, O., Scott, I., Kronenberg, M., and Cheroutre, H. (2007). Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* *317*, 256-260.
- Murphy, K. M., Ouyang, W., Farrar, J. D., Yang, J., Ranganath, S., Asnagli, H., Afkarian, M., and Murphy, T. L. (2000). Signaling and transcription in T helper development. *Annu Rev Immunol* *18*, 451-494.
- Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'Amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., van't Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, L. P., Allavena, P., and Mantovani, A. (2000). Differential expression and regulation of toll-like receptors

(TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 164, 5998-6004.

Naik, S. H., Corcoran, L. M., and Wu, L. (2005). Development of murine plasmacytoid dendritic cell subsets. *Immunol Cell Biol* 83, 563-570.

Naik, S. H., Metcalf, D., van Nieuwenhuijze, A., Wicks, I., Wu, L., O'Keeffe, M., and Shortman, K. (2006). Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat Immunol* 7, 663-671.

Nakano, H., Yanagita, M., and Gunn, M. D. (2001). CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 194, 1171-1178.

Naumov, Y. N., Bahjat, K. S., Gausling, R., Abraham, R., Exley, M. A., Koezuka, Y., Balk, S. B., Strominger, J. L., Clare-Salzer, M., and Wilson, S. B. (2001). Activation of CD1d-restricted T cells protects NOD mice from developing diabetes by regulating dendritic cell subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13838-13843.

Neijssen, J., Herberts, C., Drijfhout, J. W., Reits, E., Janssen, L., and Neefjes, J. (2005). Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature* 434, 83-88.

Ng, W. F., Duggan, P. J., Ponchel, F., Matarese, G., Lombardi, G., Edwards, A. D., Isaacs, J. D., and Lechler, R. I. (2001). Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood* 98, 2736-2744.

Nishimura, E., Sakihama, T., Setoguchi, R., Tanaka, K., and Sakaguchi, S. (2004). Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol* 16, 1189-1201.

Nishimura, T., Kitamura, H., Iwakabe, K., Yahata, T., Ohta, A., Sato, M., Takeda, K., Okumura, K., Van Kaer, L., Kawano, T., *et al.* (2000). The interface between innate and acquired immunity: glycolipid antigen presentation by CD1d-expressing dendritic cells to NKT cells induces the differentiation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol* 12, 987-994.

Noble, A., and Kemeny, D. M. (1995). Interleukin-4 and interferon-gamma regulate differentiation of CD8+ T cells into populations with divergent cytokine profiles. *Int Arch Allergy Immunol* 107, 186-188.

Norbury, C. C. (2006). Drinking a lot is good for dendritic cells. *Immunology* 117, 443-451.

Norbury, C. C., Chambers, B. J., Prescott, A. R., Ljunggren, H. G., and Watts, C. (1997). Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major

histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 27, 280-288.

O'Keeffe, M., Hochrein, H., Vremec, D., Caminschi, I., Miller, J. L., Anders, E. M., Wu, L., Lahoud, M. H., Henri, S., Scott, B., *et al.* (2002). Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8(+) dendritic cells only after microbial stimulus. *J Exp Med* 196, 1307-1319.

O'Neill E, J., Sundstedt, A., Mazza, G., Nicolson, K. S., Ponsford, M., Saurer, L., Streeter, H., Anderton, S., and Wraith, D. C. (2004). Natural and induced regulatory T cells. *Ann N Y Acad Sci* 1029, 180-192.

Ochsenbein, A. F. (2005). Immunological ignorance of solid tumors. *Springer Semin Immunopathol* 27, 19-35.

Ohashi, K., Burkart, V., Flohe, S., and Kolb, H. (2000). Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 164, 558-561.

Olweus, J., BitMansour, A., Warnke, R., Thompson, P. A., Carballido, J., Picker, L. J., and Lund-Johansen, F. (1997). Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12551-12556.

Omatsu, Y., Iyoda, T., Kimura, Y., Maki, A., Ishimori, M., Toyama-Sorimachi, N., and Inaba, K. (2005). Development of murine plasmacytoid dendritic cells defined by increased expression of an inhibitory NK receptor, Ly49Q. *J Immunol* 174, 6657-6662.

Pasare, C., and Medzhitov, R. (2003). Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 299, 1033-1036.

Patterson, S. (2000). Flexibility and cooperation among dendritic cells. *Nat Immunol* 1, 273-274.

Peiser, L., Mukhopadhyay, S., and Gordon, S. (2002). Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 14, 123-128.

Penna, G., Giarratana, N., Amuchastegui, S., Mariani, R., Daniel, K. C., and Adorini, L. (2005). Manipulating dendritic cells to induce regulatory T cells. *Microbes Infect* 7, 1033-1039.

Penna, G., Sozzani, S., and Adorini, L. (2001). Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 167, 1862-1866.

Penna, G., Vulcano, M., Roncari, A., Facchetti, F., Sozzani, S., and Adorini, L. (2002a). Cutting edge: differential chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 169, 6673-6676.

Penna, G., Vulcano, M., Sozzani, S., and Adorini, L. (2002b). Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol* 63, 1164-1171.

Pickl, W. F., Majdic, O., Kohl, P., Stockl, J., Riedl, E., Scheinecker, C., Bello-Fernandez, C., and Knapp, W. (1996). Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14⁺ peripheral blood monocytes. *J Immunol* 157, 3850-3859.

Pittoni, V., and Valesini, G. (2002). The clearance of apoptotic cells: implications for autoimmunity. *Autoimmun Rev* 1, 154-161.

Poeck, H., Wagner, M., Battiany, J., Rothenfusser, S., Wellisch, D., Hornung, V., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G. (2004). Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help. *Blood* 103, 3058-3064.

Powrie, F., Correa-Oliveira, R., Mauze, S., and Coffman, R. L. (1994). Regulatory interactions between CD45RB^{high} and CD45RB^{low} CD4⁺ T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity. *J Exp Med* 179, 589-600.

Powrie, F., Leach, M. W., Mauze, S., Caddle, L. B., and Coffman, R. L. (1993). Phenotypically distinct subsets of CD4⁺ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int Immunol* 5, 1461-1471.

Powrie, F., and Mason, D. (1990). OX-22^{high} CD4⁺ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22^{low} subset. *J Exp Med* 172, 1701-1708.

Prigozy, T. I., Naidenko, O., Qasba, P., Elewaut, D., Brossay, L., Khurana, A., Natori, T., Koezuka, Y., Kulkarni, A., and Kronenberg, M. (2001). Glycolipid antigen processing for presentation by CD1d molecules. *Science* 291, 664-667.

Pugh, C. W., MacPherson, G. G., and Steer, H. W. (1983). Characterization of nonlymphoid cells derived from rat peripheral lymph. *J Exp Med* 157, 1758-1779.

Pulendran, B., Banchereau, J., Burkeholder, S., Kraus, E., Guinet, E., Chalouni, C., Caron, D., Maliszewski, C., Davoust, J., Fay, J., and Palucka, K. (2000). Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J Immunol* *165*, 566-572.

Pulendran, B., Lingappa, J., Kennedy, M. K., Smith, J., Teepe, M., Rudensky, A., Maliszewski, C. R., and Maraskovsky, E. (1997). Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. *J Immunol* *159*, 2222-2231.

Racke, F. K., Clare-Salzer, M., and Wilson, S. B. (2002). Control of myeloid dendritic cell differentiation and function by CD1d-restricted (NK) T cells. *Front Biosci* *7*, d978-985.

Read, S., Malmstrom, V., and Powrie, F. (2000). Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* *192*, 295-302.

Redmond, W. L., Marincek, B. C., and Sherman, L. A. (2005). Distinct requirements for deletion versus anergy during CD8 T cell peripheral tolerance in vivo. *J Immunol* *174*, 2046-2053.

Regnault, A., Lankar, D., Lacabanne, V., Rodriguez, A., They, C., Rescigno, M., Saito, T., Verbeek, S., Bonnerot, C., Ricciardi-Castagnoli, P., and Amigorena, S. (1999). Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med* *189*, 371-380.

Reid, S. D., Penna, G., and Adorini, L. (2000). The control of T cell responses by dendritic cell subsets. *Curr Opin Immunol* *12*, 114-121.

Reis e Sousa, C. (2004). Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin Immunol* *16*, 27-34.

Reis e Sousa, C. (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* *6*, 476-483.

Reis e Sousa, C., and Germain, R. N. (1999). Analysis of adjuvant function by direct visualization of antigen presentation in vivo: endotoxin promotes accumulation of antigen-bearing dendritic cells in the T cell areas of lymphoid tissue. *J Immunol* *162*, 6552-6561.

Res, P., Martinez-Caceres, E., Cristina Jaleco, A., Staal, F., Noteboom, E., Weijer, K., and Spits, H. (1996). CD34+CD38dim cells in the human thymus can

differentiate into T, natural killer, and dendritic cells but are distinct from pluripotent stem cells. *Blood* 87, 5196-5206.

Res, P. C., Couwenberg, F., Vyth-Dreese, F. A., and Spits, H. (1999). Expression of pTalpha mRNA in a committed dendritic cell precursor in the human thymus. *Blood* 94, 2647-2657.

Rescigno, M., Citterio, S., They, C., Rittig, M., Medaglini, D., Pozzi, G., Amigorena, S., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1998). Bacteria-induced neobiosynthesis, stabilization, and surface expression of functional class I molecules in mouse dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5229-5234.

Rissoan, M. C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal Malefyt, R., and Liu, Y. J. (1999). Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283, 1183-1186.

Rodriguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P., and Amigorena, S. (1999). Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol* 1, 362-368.

Romani, N., Ratzinger, G., Pfaller, K., Salvenmoser, W., Stossel, H., Koch, F., and Stoitzner, P. (2001). Migration of dendritic cells into lymphatics-the Langerhans cell example: routes, regulation, and relevance. *Int Rev Cytol* 207, 237-270.

Roncarolo, M. G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K., and Levings, M. K. (2006). Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 212, 28-50.

Ronnblom, L., and Alm, G. V. (2001). A pivotal role for the natural interferon alpha-producing cells (plasmacytoid dendritic cells) in the pathogenesis of lupus. *J Exp Med* 194, F59-63.

Rossi, D., and Zlotnik, A. (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18, 217-242.

Roth, M. G. (2006). Clathrin-mediated endocytosis before fluorescent proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 63-68.

Rothenfusser, S., Hornung, V., Ayyoub, M., Britsch, S., Towarowski, A., Krug, A., Sarris, A., Lubenow, N., Speiser, D., Endres, S., and Hartmann, G. (2004). CpG-A and CpG-B oligonucleotides differentially enhance human peptide-specific primary and memory CD8+ T-cell responses in vitro. *Blood* 103, 2162-2169.

Roumier, A., Olivo-Marin, J. C., Arpin, M., Michel, F., Martin, M., Mangeat, P., Acuto, O., Dautry-Varsat, A., and Alcover, A. (2001). The membrane-microfilament linker ezrin is involved in the formation of the immunological synapse and in T cell activation. *Immunity* 15, 715-728.

Rovere, P., Vallinoto, C., Bondanza, A., Crosti, M. C., Rescigno, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Rugarli, C., and Manfredi, A. A. (1998). Bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigen-presenting function. *J Immunol* *161*, 4467-4471.

Rutella, S., and Lemoli, R. M. (2004). Regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells: from basic biology to clinical applications. *Immunol Lett* *94*, 11-26.

Sad, S., and Mosmann, T. R. (1995). Interleukin (IL) 4, in the absence of antigen stimulation, induces an anergy-like state in differentiated CD8⁺ TC1 cells: loss of IL-2 synthesis and autonomous proliferation but retention of cytotoxicity and synthesis of other cytokines. *J Exp Med* *182*, 1505-1515.

Sakaguchi, S. (2004). Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* *22*, 531-562.

Sakaguchi, S. (2005). Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* *6*, 345-352.

Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T., and Nomura, T. (2006). Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* *212*, 8-27.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (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. *J Immunol* *155*, 1151-1164.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakihama, T., Itoh, M., Kuniyasu, Y., Nomura, T., Toda, M., and Takahashi, T. (2001). Immunologic tolerance maintained by CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* *182*, 18-32.

Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* *182*, 389-400.

Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* *179*, 1109-1118.

Sallusto, F., Lanzavecchia, A., and Mackay, C. R. (1998). Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today* 19, 568-574.

Salomon, B., Lenschow, D. J., Rhee, L., Ashourian, N., Singh, B., Sharpe, A., and Bluestone, J. A. (2000). B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12, 431-440.

Sanghavi, S. K., Shankarappa, R., and Reinhart, T. A. (2004). Genetic analysis of Toll/Interleukin-1 Receptor (TIR) domain sequences from rhesus macaque Toll-like receptors (TLRs) 1-10 reveals high homology to human TLR/TIR sequences. *Immunogenetics* 56, 667-674.

Santini, S. M., Lapenta, C., Logozzi, M., Parlato, S., Spada, M., Di Pucchio, T., and Belardelli, F. (2000). Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *J Exp Med* 191, 1777-1788.

Sauter, B., Albert, M. L., Francisco, L., Larsson, M., Somersan, S., and Bhardwaj, N. (2000). Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 191, 423-434.

Sayegh, M. H., and Turka, L. A. (1998). The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N Engl J Med* 338, 1813-1821.

Schluns, K. S., Kieper, W. C., Jameson, S. C., and Lefrancois, L. (2000). Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* 1, 426-432.

Schnare, M., Barton, G. M., Holt, A. C., Takeda, K., Akira, S., and Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2, 947-950.

Schott, M. (2006). Immunesurveillance by dendritic cells: potential implication for immunotherapy of endocrine cancers. *Endocr Relat Cancer* 13, 779-795.

Schulz, O., Diebold, S. S., Chen, M., Naslund, T. I., Nolte, M. A., Alexopoulou, L., Azuma, Y. T., Flavell, R. A., Liljestrom, P., and Reis e Sousa, C. (2005). Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* 433, 887-892.

Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., Zaunders, J., Sasson, S., Landay, A., Solomon, M., Selby, W., Alexander, S. I., Nanan, R., *et al.* (2006).

Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 203, 1693-1700.

Seddon, B., and Mason, D. (1999). Regulatory T cells in the control of autoimmunity: the essential role of transforming growth factor beta and interleukin 4 in the prevention of autoimmune thyroiditis in rats by peripheral CD4(+)CD45RC- cells and CD4(+)CD8(-) thymocytes. *J Exp Med* 189, 279-288.

Seddon, B., Saoudi, A., Nicholson, M., and Mason, D. (1996). CD4+CD8-thymocytes that express L-selectin protect rats from diabetes upon adoptive transfer. *Eur J Immunol* 26, 2702-2708.

Serbina, N. V., Salazar-Mather, T. P., Biron, C. A., Kuziel, W. A., and Pamer, E. G. (2003). TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* 19, 59-70.

Serwold, T., Gonzalez, F., Kim, J., Jacob, R., and Shastri, N. (2002). ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 419, 480-483.

Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., and Sakaguchi, S. (2005). Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med* 201, 723-735.

Shahinian, A., Pfeffer, K., Lee, K. P., Kundig, T. M., Kishihara, K., Wakeham, A., Kawai, K., Ohashi, P. S., Thompson, C. B., and Mak, T. W. (1993). Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 261, 609-612.

Shevach, E. M. (2001). Certified professionals: CD4(+)CD25(+) suppressor T cells. *J Exp Med* 193, F41-46.

Shevach, E. M., McHugh, R. S., Piccirillo, C. A., and Thornton, A. M. (2001). Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. *Immunol Rev* 182, 58-67.

Shortman, K. (2000). Burnet oration: dendritic cells: multiple subtypes, multiple origins, multiple functions. *Immunol Cell Biol* 78, 161-165.

Shortman, K., and Liu, Y. J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2, 151-161.

Siegal, F. P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P. A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y. J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284, 1835-1837.

Sigal, L. J., and Rock, K. L. (2000). Bone marrow-derived antigen-presenting cells are required for the generation of cytotoxic T lymphocyte responses to viruses and use transporter associated with antigen presentation (TAP)-dependent and -independent pathways of antigen presentation. *J Exp Med* *192*, 1143-1150.

Smith, K. D., Andersen-Nissen, E., Hayashi, F., Strobe, K., Bergman, M. A., Barrett, S. L., Cookson, B. T., and Aderem, A. (2003). Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol* *4*, 1247-1253.

Sorg, R. V., Kogler, G., and Wernet, P. (1999). Identification of cord blood dendritic cells as an immature CD11c- population. *Blood* *93*, 2302-2307.

Sozzani, S. (2005). Dendritic cell trafficking: more than just chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev* *16*, 581-592.

Sozzani, S., Allavena, P., D'Amico, G., Luini, W., Bianchi, G., Kataura, M., Imai, T., Yoshie, O., Bonecchi, R., and Mantovani, A. (1998). Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* *161*, 1083-1086.

Steinman, L. (2007). A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* *13*, 139-145.

Steinman, R. M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* *9*, 271-296.

Steinman, R. M., and Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* *137*, 1142-1162.

Steinman, R. M., Hawiger, D., Liu, K., Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Iyoda, T., Ravetch, J., Dhodapkar, M., Inaba, K., and Nussenzweig, M. (2003). Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci* *987*, 15-25.

Steinman, R. M., and Inaba, K. (1999). Myeloid dendritic cells. *J Leukoc Biol* *66*, 205-208.

Steinman, R. M., and Nussenzweig, M. C. (2002). Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 351-358.

Steinman, R. M., Pack, M., and Inaba, K. (1997). Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunol Rev* *156*, 25-37.

Steinman, R. M., Turley, S., Mellman, I., and Inaba, K. (2000). The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* *191*, 411-416.

Stephens, L. A., Barclay, A. N., and Mason, D. (2004). Phenotypic characterization of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells in rats. *Int Immunol* *16*, 365-375.

Stephens, L. A., and Mason, D. (2000). CD25 is a marker for CD4⁺ thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25⁺ and CD25⁻ subpopulations. *J Immunol* *165*, 3105-3110.

Strobl, H., Scheinecker, C., Riedl, E., Csmarits, B., Bello-Fernandez, C., Pickl, W. F., Majdic, O., and Knapp, W. (1998). Identification of CD68⁺lin⁻ peripheral blood cells with dendritic precursor characteristics. *J Immunol* *161*, 740-748.

Strunk, D., Egger, C., Leitner, G., Hanau, D., and Stingl, G. (1997). A skin homing molecule defines the langerhans cell progenitor in human peripheral blood. *J Exp Med* *185*, 1131-1136.

Stumhofer, J. S., Laurence, A., Wilson, E. H., Huang, E., Tato, C. M., Johnson, L. M., Villarino, A. V., Huang, Q., Yoshimura, A., Sehy, D., *et al.* (2006). Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol* *7*, 937-945.

Subklewe, M., Paludan, C., Tsang, M. L., Mahnke, K., Steinman, R. M., and Munz, C. (2001). Dendritic cells cross-present latency gene products from Epstein-Barr virus-transformed B cells and expand tumor-reactive CD8⁺ killer T cells. *J Exp Med* *193*, 405-411.

Sundstedt, A., O'Neill, E. J., Nicolson, K. S., and Wraith, D. C. (2003). Role for IL-10 in suppression mediated by peptide-induced regulatory T cells in vivo. *J Immunol* *170*, 1240-1248.

Supajatura, V., Ushio, H., Nakao, A., Okumura, K., Ra, C., and Ogawa, H. (2001). Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. *J Immunol* *167*, 2250-2256.

Swanson, J. A., and Watts, C. (1995). Macropinocytosis. *Trends Cell Biol* *5*, 424-428.

- Taams, L. S., and Akbar, A. N. (2005). Peripheral generation and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 293, 115-131.
- Taguchi, T., Mitcham, J. L., Dower, S. K., Sims, J. E., and Testa, J. R. (1996). Chromosomal localization of TIL, a gene encoding a protein related to the Drosophila transmembrane receptor Toll, to human chromosome 4p14. *Genomics* 32, 486-488.
- Taieb, J., Chaput, N., Menard, C., Apetoh, L., Ullrich, E., Bonmort, M., Pequignot, M., Casares, N., Terme, M., Flament, C., *et al.* (2006). A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nat Med* 12, 214-219.
- Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T. W., and Sakaguchi, S. (2000). Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 192, 303-310.
- Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R. L., and Akira, S. (2002). Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 169, 10-14.
- Tanaka, H., Demeure, C. E., Rubio, M., Delespesse, G., and Sarfati, M. (2000). Human monocyte-derived dendritic cells induce naive T cell differentiation into T helper cell type 2 (Th2) or Th1/Th2 effectors. Role of stimulator/responder ratio. *J Exp Med* 192, 405-412.
- Tang, A., Amagai, M., Granger, L. G., Stanley, J. R., and Udey, M. C. (1993). Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature* 361, 82-85.
- Tang, Q., Henriksen, K. J., Boden, E. K., Tooley, A. J., Ye, J., Subudhi, S. K., Zheng, X. X., Strom, T. B., and Bluestone, J. A. (2003). Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 171, 3348-3352.
- Taylor, P. A., Lees, C. J., and Blazar, B. R. (2002). The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 99, 3493-3499.
- Thornton, A. M., and Shevach, E. M. (1998). CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188, 287-296.
- Thornton, A. M., and Shevach, E. M. (2000). Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 164, 183-190.

- Toda, A., and Piccirillo, C. A. (2006). Development and function of naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol* 80, 458-470.
- Tordjman, R., Lepelletier, Y., Lemarchandel, V., Cambot, M., Gaulard, P., Hermine, O., and Romeo, P. H. (2002). A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response. *Nat Immunol* 3, 477-482.
- Toyama-Sorimachi, N., Tsujimura, Y., Maruya, M., Onoda, A., Kubota, T., Koyasu, S., Inaba, K., and Karasuyama, H. (2004). Ly49Q, a member of the Ly49 family that is selectively expressed on myeloid lineage cells and involved in regulation of cytoskeletal architecture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1016-1021.
- Trinchieri, G., Pflanz, S., and Kastelein, R. A. (2003). The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* 19, 641-644.
- Trinchieri, G., and Sher, A. (2007). Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 7, 179-190.
- Trinite, B., Voisine, C., Yagita, H., and Josien, R. (2000). A subset of cytolytic dendritic cells in rat. *J Immunol* 165, 4202-4208.
- Trombetta, E. S., and Mellman, I. (2005). Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol* 23, 975-1028.
- Tsaknaridis, L., Spencer, L., Culbertson, N., Hicks, K., LaTocha, D., Chou, Y. K., Whitham, R. H., Bakke, A., Jones, R. E., Offner, H., *et al.* (2003). Functional assay for human CD4+CD25+ Treg cells reveals an age-dependent loss of suppressive activity. *J Neurosci Res* 74, 296-308.
- Valladeau, J., Ravel, O., Dezutter-Dambuyant, C., Moore, K., Kleijmeer, M., Liu, Y., Duvert-Frances, V., Vincent, C., Schmitt, D., Davoust, J., *et al.* (2000). Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 12, 71-81.
- van Parijs, L., Perez, V. L., and Abbas, A. K. (1998). Mechanisms of peripheral T cell tolerance. *Novartis Found Symp* 215, 5-14; discussion 14-20, 33-40.
- Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M., and Stockinger, B. (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24, 179-189.
- Verthelyi, D., Ishii, K. J., Gursel, M., Takeshita, F., and Klinman, D. M. (2001). Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs. *J Immunol* 166, 2372-2377.

Villadangos, J. A., and Heath, W. R. (2005). Life cycle, migration and antigen presenting functions of spleen and lymph node dendritic cells: limitations of the Langerhans cells paradigm. *Semin Immunol* 17, 262-272.

Villadangos, J. A., and Schnorrer, P. (2007). Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol* 7, 543-555.

Voisine, C., Hubert, F. X., Trinite, B., Heslan, M., and Josien, R. (2002). Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *J Immunol* 169, 2284-2291.

Vollmer, J., Weeratna, R., Payette, P., Jurk, M., Schetter, C., Laucht, M., Wader, T., Tluk, S., Liu, M., Davis, H. L., and Krieg, A. M. (2004). Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur J Immunol* 34, 251-262.

von Andrian, U. H., and Mackay, C. R. (2000). T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med* 343, 1020-1034.

von Boehmer, H. (2005). Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 6, 338-344.

von Boehmer, H., and Hafen, K. (1986). Minor but not major histocompatibility antigens of thymus epithelium tolerize precursors of cytolytic T cells. *Nature* 320, 626-628.

Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L., and Shortman, K. (2000). CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol* 164, 2978-2986.

Vukmanovic-Stejic, M., Vyas, B., Gorak-Stolinska, P., Noble, A., and Kemeny, D. M. (2000). Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. *Blood* 95, 231-240.

Wagner, H. (2004). The immunobiology of the TLR9 subfamily. *Trends Immunol* 25, 381-386.

Wakkach, A., Fournier, N., Brun, V., Breitmayer, J. P., Cottrez, F., and Groux, H. (2003). Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* 18, 605-617.

Waldmann, H., Chen, T. C., Graca, L., Adams, E., Daley, S., Cobbold, S., and Fairchild, P. J. (2006). Regulatory T cells in transplantation. *Semin Immunol* 18, 111-119.

- Walunas, T. L., Bakker, C. Y., and Bluestone, J. A. (1996). CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J Exp Med* *183*, 2541-2550.
- Wang, X., Moser, C., Louboutin, J. P., Lysenko, E. S., Weiner, D. J., Weiser, J. N., and Wilson, J. M. (2002). Toll-like receptor 4 mediates innate immune responses to *Haemophilus influenzae* infection in mouse lung. *J Immunol* *168*, 810-815.
- Weiner, H. L. (1997). Oral tolerance for the treatment of autoimmune diseases. *Annu Rev Med* *48*, 341-351.
- Weiner, H. L. (2001a). Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* *182*, 207-214.
- Weiner, H. L. (2001b). Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect* *3*, 947-954.
- Wells, A. D., Li, X. C., Strom, T. B., and Turka, L. A. (2001). The role of peripheral T-cell deletion in transplantation tolerance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* *356*, 617-623.
- Welner, R. S., Pelayo, R., Garrett, K. P., Chen, X., Perry, S. S., Sun, X. H., Kee, B. L., and Kincade, P. W. (2007). Interferon-producing killer dendritic cells (IKDCs) arise via a unique differentiation pathway from primitive c-kit^{hi}CD62L⁺ lymphoid progenitors. *Blood* *109*, 4825-4931.
- Wildin, R. S., Ramsdell, F., Peake, J., Faravelli, F., Casanova, J. L., Buist, N., Levy-Lahad, E., Mazzella, M., Goulet, O., Perroni, L., *et al.* (2001). X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* *27*, 18-20.
- Wing, K., Ekmark, A., Karlsson, H., Rudin, A., and Suri-Payer, E. (2002). Characterization of human CD25⁺ CD4⁺ T cells in thymus, cord and adult blood. *Immunology* *106*, 190-199.
- Wing, K., Suri-Payer, E., and Rudin, A. (2005). CD4⁺CD25⁺-regulatory T cells from mouse to man. *Scand J Immunol* *62*, 1-15.
- Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Thery, C., Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Tursz, T., *et al.* (2001). Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* *7*, 297-303.
- Wolfs, T. G., Buurman, W. A., van Schadewijk, A., de Vries, B., Daemen, M. A., Hiemstra, P. S., and van 't Veer, C. (2002). In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. *J Immunol* *168*, 1286-1293.

Wu, L., D'Amico, A., Hochrein, H., O'Keeffe, M., Shortman, K., and Lucas, K. (2001). Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors. *Blood* *98*, 3376-3382.

Wu, L., and Dakic, A. (2004). Development of dendritic cell system. *Cell Mol Immunol* *1*, 112-118.

Wu, L., and Liu, Y. J. (2007). Development of dendritic-cell lineages. *Immunity* *26*, 741-750.

Xystrakis, E., Dejean, A. S., Bernard, I., Druet, P., Liblau, R., Gonzalez-Dunia, D., and Saoudi, A. (2004). Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation. *Blood* *104*, 3294-3301.

Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., and Akira, S. (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* *301*, 640-643.

Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K., and Akira, S. (2002). Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* *169*, 6668-6672.

Yamazaki, S., Iyoda, T., Tarbell, K., Olson, K., Velinzon, K., Inaba, K., and Steinman, R. M. (2003). Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med* *198*, 235-247.

Yang, G. X., Lian, Z. X., Kikuchi, K., Moritoki, Y., Ansari, A. A., Liu, Y. J., Ikehara, S., and Gershwin, M. E. (2005). Plasmacytoid dendritic cells of different origins have distinct characteristics and function: studies of lymphoid progenitors versus myeloid progenitors. *J Immunol* *175*, 7281-7287.

Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J. F., Bannenberg, G. L., Serhan, C. N., Hayden, M. S., Hieny, S., Sutterwala, F. S., Flavell, R. A., Ghosh, S., and Sher, A. (2005). TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* *308*, 1626-1629.

Yoneyama, H., Matsuno, K., Zhang, Y., Nishiwaki, T., Kitabatake, M., Ueha, S., Narumi, S., Morikawa, S., Ezaki, T., Lu, B., *et al.* (2004). Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules. *Int Immunol* *16*, 915-928.

Yonezawa, A., Morita, R., Takaori-Kondo, A., Kadowaki, N., Kitawaki, T., Hori, T., and Uchiyama, T. (2003). Natural alpha interferon-producing cells respond to human immunodeficiency virus type 1 with alpha interferon production and maturation into dendritic cells. *J Virol* *77*, 3777-3784.

Yu, C. Y., and Milstein, C. (1989). A physical map linking the five CD1 human thymocyte differentiation antigen genes. *Embo J* 8, 3727-3732.

Zarembek, K. A., and Godowski, P. J. (2002). Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 168, 554-561.

Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M. S., Greenblatt, M. B., Bussey, C., Flavell, R. A., and Ghosh, S. (2004). A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 303, 1522-1526.

Zhang, Z. X., Young, K., and Zhang, L. (2001). CD3+CD4-CD8- alphabeta-TCR+ T cell as immune regulatory cell. *J Mol Med* 79, 419-427.

Zheng, S. G., Gray, J. D., Ohtsuka, K., Yamagiwa, S., and Horwitz, D. A. (2002). Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors. *J Immunol* 169, 4183-4189.

Zheng, S. G., Wang, J. H., Gray, J. D., Soucier, H., and Horwitz, D. A. (2004). Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. *J Immunol* 172, 5213-5221.

Zhu, X., Meng, G., Dickinson, B. L., Li, X., Mizoguchi, E., Miao, L., Wang, Y., Robert, C., Wu, B., Smith, P. D., *et al.* (2001). MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG is functionally expressed in monocytes, intestinal macrophages, and dendritic cells. *J Immunol* 166, 3266-3276.

Zou, W., Machelon, V., Coulomb-L'Hermin, A., Borvak, J., Nome, F., Isaeva, T., Wei, S., Krzysiek, R., Durand-Gassel, I., Gordon, A., *et al.* (2001). Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med* 7, 1339-1346.

ETUDE DU ROLE DES SOUS-POPULATIONS DE CELLULES DENDRITIQUES DANS L'EXPANSION ET LES FONCTIONS DES CELLULES T REGULATRICES CHEZ LE RAT

Nous avons analysé chez le rat l'influence des différentes populations de cellules dendritiques (DC) sur la prolifération et l'activité suppressive des cellules T régulatrices naturelles (Treg) in vitro. Les populations de DC sont purifiées à partir de la rate et séparées en: DC CD 103+ CD45R- CD4+ (DC CD4+), les DC CD103+ CD45R- CD4- (DC CD4-) et les DC CD 103- CD45R+ CD4+ ou DC plasmacytoides (pDC). Nos résultats montrent que les trois sous- populations de DC matures induisent une forte prolifération des cellules TCD4+CD25- allogéniques mais que, contrairement aux DC dites conventionnelles (DC CD4+ et DC CD4-), les pDC matures stimulées via TLR7 ou 9 induisent en absence d'IL-2 exogène une forte prolifération des cellules TCD4+CD25+FOXP-3+ (Treg), réputées hypoprolifératives in vitro. Cette prolifération est indépendante de l'IL-2, nécessite un contact cellulaire et est partiellement dépendante de CD86. Les populations de DC ont également un impact différent sur l'activité suppressive des Treg in vitro. En présence de DC conventionnelles matures, les Treg suppriment fortement la prolifération et la production d'IL-2 et d'IFN- γ par les cellules T effectrices alors qu'en présence de pDC, les Treg suppriment la production d'IL-2 mais pas la prolifération ni la production d'IFN- γ des cellules T effectrices. Nos résultats indiquent que l'anergie et la fonction suppressive des Treg sont différenciellement contrôlées par les sous- populations de DC et suggèrent un rôle des pDC dans le contrôle des Treg in vivo.

Mots clés :

Cellules dendritiques ; Cellules T régulatrices; Tolérance

STUDY OF THE ROLE OF DENDRITIC CELLS SUBSETS IN THE EXPANSION AND FUNCTION OF REGULATORY T CELLS (T REG) IN THE RAT

We have analysed in the rat the influence of different dendritic cell (DC) subsets on the proliferation and the suppressive activity of naturally occurring T regulatory cells (Treg) in vitro. DC subsets were purified from spleen and separated as: CD103+CD45R-CD4+ (CD4+ DC), CD103+CD45R-CD4- (CD4- DC) and CD103-CD45R+CD4+ or plasmacytoid DC (pDC). Our results show that the three mature DC subsets tested induced a strong proliferation of allogenic CD4+CD25-' Tcell but that, unlike conventional DC subsets (CD4- DC and CD4+ DC), mature pDC stimulated with TLR7 or 9 induce, in the absence of exogenous IL-2, a robust proliferative response of CD4+CD25+FOXP-3+ T cells (Treg), which are reputed hypoproliferative in vitro. Expansion of Treg by pDC is IL-2 independent, requires cell contact and is partially CD86-dependent. DC subsets also differentially control the suppressive activity of Treg in vitro. In the presence of conventional DC, Treg strongly suppress proliferation of, as well as IL-2 and IFN- γ production by effector T cells, whereas in the presence of pDC, Treg suppress IL-2 production by effector T cells but not their proliferation and IFN- γ production. Our results indicate that anergy and suppressive activity of Treg are differentially controlled by DC subsets and suggest a role for pDC in the control of Treg in vivo.

KeyWords:

Dendritic cells; T regulatory cells; Tolerance