

UNIVERSITE DE NANTES  
FACULTE DE MEDECINE

**PHENOTYPES ET FONCTIONS DES SOUS-POPULATIONS  
DE CELLULES DENDRITIQUES CHEZ LE RAT.**

Thèse de doctorat

Ecole Doctorale : Chimie-Biologie  
Discipline : Sciences de la vie et de la santé  
Spécialité : Immunologie

*Présentée et soutenue publiquement par*

**Cécile VOISINE**

**Le 6 juin 2003, devant le jury ci-dessous :**

<b>Rapporteurs</b>	M. Abdelhadi SAOUDI, Chargé de Recherche, Toulouse Mme Francine BRIERE, Chargé de Recherche, Dardilly
<b>Examineurs</b>	M. Marc GREGOIRE, directeur de recherche, Nantes M. Carlos ARDAVIN, Professeur, Madrid M. Jaques DANTAL, Professeur, Nantes
<b>Directeur de thèse</b>	M. Régis JOSIEN, chargé de Recherche, Nantes

INSERM U437-ITERT  
Dirigé par le Pr. J.P. Soullillou

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout d'abord Jean-Paul Soulillou pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et permis de réaliser ce travail dans de bonnes conditions.

Je remercie tout particulièrement Régis Josien pour m'avoir guidée au long de ces quatre années, pour sa disponibilité, son dynamisme et sa motivation.

Je remercie également Cristina Cuturi dont les remarques constructives ont toujours alimenté les discussions de nos résultats.

Je tiens à remercier particulièrement les personnes qui m'ont assistée techniquement pendant ma thèse et en premier lieu Nelly Robillard qui a réalisé l'ensemble des tris cellulaires pendant quatre années. Je remercie également Gilbert Pradal pour avoir réalisé la microscopie électronique et le personnel de l'animalerie (Claire, Emmanuel, Bernard, Elisabeth).

Je tiens à remercier l'ensemble des membres actuels ou passés de l'unité 437 : Elise, Karine, Flora, Laurent, Marina, Fabien, Gwénola, Delphine, Cécile et Cécile, Joëlle, Delphine, Véronique, Carole.

Je remercie les membres de l'équipe 1 : Michèle et Jean-Marie pour leur sympathie et leurs conseils techniques, Benjamin pour sa disponibilité à résoudre mes petits tracas techniques et informatiques, Hélène pour m'avoir intégrée dans l'équipe dès mon arrivée et pour nos discussions scientifiques, FX : mon secrétaire, pour notre travail en commun, Camille, enfin une fille dans l'équipe et plus particulièrement Cédric qui m'a formée au monde obscur de la Biologie Moléculaire, JB dit "le Sauvage" pour ses conseils de Bio-statisticien comme pour ses farces et attrapes quotidiennes et Gaëlle pour son aide à l'animalerie, pour son soutien lors de la rédaction de ma thèse et pour sa complicité.

Je remercie également Juliette pour sa gaieté, son dynamisme, sa motivation communicative et pour sa complicité ainsi que Johanna pour son humour, sa gentillesse et son anglais irréprochable.

Je remercie le trio Fabie, Solène, Nicolas pour nos discussions, et pour m'avoir convaincu des bienfaits du sport, Marcello qui ne m'a toujours pas appris l'espagnol.

Je remercie également les membres de l'équipe « bizarre » David, Caroline et Benoît toujours là pour écouter, aider ou aller au Rétro.

Je remercie aussi ma mère (M\*C) pour m'avoir toujours écouté raconter « mes histoires de labo » et pour avoir relu et corrigé l'orthographe de mon manuscrit de thèse. Je remercie enfin Fred qui est toujours là pour m'aider et pour tous ses week end sacrifiés.

Je tiens également à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux.

# SOMMAIRE

<b>ABREVIATIONS</b>	<b>p9</b>
<b>RESUME</b>	<b>p10</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>p11</b>

## INTRODUCTION

<b><u>I. Les cellules dendritiques : généralités.</u></b>	<b>p13</b>
<b>I.1. Historique.</b>	<b>p13</b>
<b>I.2. Fonctions principales des cellules dendritiques au cours de la réponse immunitaire.</b>	<b>p14</b>
<b>I.3. La diversité des cellules dendritiques.</b>	<b>p15</b>
I.3.1. Les sous-populations de cellules dendritiques.	p15
I.3.2. La localisation des cellules dendritiques.	p16
a. Les cellules dendritiques des tissus.	p17
b. Les cellules dendritiques des organes lymphoïdes.	p17
c. Les cellules dendritiques de la lymphe et du sang.	p18
<b><u>II. Ontogénie des cellules dendritiques.</u></b>	<b>p19</b>
<b>II.1. Ontogénie des cellules dendritiques chez l'homme.</b>	<b>p20</b>
<b>II.2. Ontogénie des cellules dendritiques chez la souris.</b>	<b>p22</b>
<b>II.3. Les arguments pour un développement lymphoïde des cellules dendritiques plasmacytoïdes.</b>	<b>p24</b>
<b><u>III. Fonctions des cellules dendritiques immatures.</u></b>	<b>p25</b>
<b>III.1. La capture antigénique par les cellules dendritiques immatures.</b>	<b>p26</b>
III.1.1. Mécanismes de capture antigénique par les cellules dendritiques.	p26
III.1.2. Les récepteurs de capture de l'antigène sur les cellules dendritiques.	p27
a. Les récepteurs de la famille des lectines de type C.	p28

b. Les autres récepteurs de capture de l'antigène.	p30
<b>III.2. Chargement des peptides sur les molécules du CMH.</b>	<b>p30</b>
III.2.1. Molécules de CMH de classe II.	p30
III.2.2. Molécules de CMH de classe I.	p32
III.2.3. La présentation croisée.	p33
III.2.4. La présentation sur les molécules CD1.	p34
<b><u>IV. Maturation des cellules dendritiques.</u></b>	<b>p35</b>
IV.1. Facteurs induisant la maturation des cellules dendritiques et leurs récepteurs.	p35
IV.1.1. Les TLR (Toll Like Receptor) : les récepteurs des PAMPs.	<b>p36</b>
a. Description des TLR.	<b>p36</b>
b. Expression des TLR sur les cellules dendritiques.	<b>p40</b>
c. TLR et modulation de la réponse immune.	<b>p41</b>
IV.1.2. Les facteurs de maturation indirecte des cellules dendritiques.	<b>p44</b>
IV.1.3. Les signaux dépendant des lymphocytes T.	<b>p45</b>
IV.2. Changements phénotypiques et fonctionnels associés à la maturation.	<b>p45</b>
<b><u>V. Les migrations des cellules dendritiques.</u></b>	<b>p48</b>
<b><u>VI. Fonction des cellules dendritiques matures : la stimulation des lymphocytes T.</u></b>	<b>p52</b>
VI.1. Les molécules de costimulation nécessaires à l'interaction cellules dendritiques / cellules T.	<b>p52</b>
VI.2. La différenciation des lymphocytes T.	<b>p55</b>
VI.2.1. Les lymphocytes T CD4.	p56
VI.2.2. Les lymphocytes T CD8.	p57
<b><u>VII. Hétérogénéité et plasticité des cellules dendritiques.</u></b>	<b>p58</b>
VII.1. Les sous populations de cellules dendritiques chez l'homme.	<b>p59</b>
VII.1.1. Les cellules dendritiques <i>in vivo</i> .	p59

a. Les cellules dendritiques des tissus.	p59
b. Les cellules dendritiques des organes lymphoïdes.	p62
c. Les cellules dendritiques et leurs précurseurs sanguins.	p63
VII.1.2. Les cellules dendritiques générées <i>in vitro</i> .	p72
<b>VII.2. Les sous-populations de cellules dendritiques chez la souris.</b>	<b>p73</b>
VII.2.1. Les cellules de Langerhans.	p73
VII.2.2. Les cellules dendritiques des organes lymphoïdes.	p74
a. Définition.	p74
b. Caractéristiques et fonctions.	p75
VII.2.3. Les précurseurs de cellules dendritiques.	p81
a. Les monocytes.	p81
b. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes.	p81
<b>VII.3. Les sous-populations de cellules dendritiques chez le rat.</b>	<b>p84</b>
<b>VII.4. La plasticité des cellules dendritiques.</b>	<b>p86</b>
<b><u>VIII. Cellules dendritiques et tolérance.</u></b>	<b>p88</b>
VIII.1. La tolérance centrale.	p89
VIII.2. La tolérance périphérique.	p89
<b><u>IX. Les cellules dendritiques et l'immunothérapie anti-cancéreuse.</u></b>	<b>p94</b>
<b>BUTS DE L'ETUDE</b>	<b>p97</b>
<b>RESULTATS</b>	
<b><u>I. Marqueurs et méthodes de purification des cellules dendritiques chez le rat.</u></b>	<b>p100</b>

<b>I.1 Marqueurs des cellules dendritiques chez le rat.</b>	<b>.p100</b>
I.1.1. Marqueurs généraux.	.p100
I.1.2. Marqueurs spécifiques du rat.	.p100
<b>I.2. Purification des cellules dendritiques chez le rat.</b>	<b>p103</b>
<b><u>II. Fonctions anti-tumorales des cellules dendritiques.</u></b>	<b>p105</b>
<b>II.1. Activité cytotolytique directe anti-tumorale des cellules dendritiques.</b>	<b>p105</b>
<b>II.1.1. Article n° 1 : Trinité et al. 2000.</b>	<b>p105</b>
II.1.2. Résultats additionnels et discussion.	p115
a. Identification d'une population de cellules dendritiques cytotoxique dans les organes lymphoïdes.	p115
b. Lien entre la nature des cibles tumorales et la cytotoxicité des cellules dendritiques.	p116
c. Les cellules dendritiques cytotoxiques : lien entre l'immunité innée et acquise.	p117
<b>II.2. Cellules dendritiques et phagocytose : article n°2 : Masse et al. 2002.</b>	<b>p120</b>
II.2.1. Discussion.	p130
<b><u>III. Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des sous-populations de cellules dendritiques spléniques.</u></b>	<b>p131</b>
<b>III.1. Caractérisation des sous-populations de cellules dendritiques spléniques OX62+.</b>	<b>p131</b>
III.1.1. Article n°3 : Voisine et al. 2002.	p131
<b>III.1.2. Résultats additionnels et discussion.</b>	<b>p142</b>
a. Morphologie des sous-populations de cellules dendritiques OX62 spléniques.	p142
b. Production d'IL12p70 par les sous-populations de DC OX62 spléniques.	p143
c. Différentiation de lymphocytes T cytotoxiques <i>in vitro</i> par les sous-populations de cellules dendritiques OX62 spléniques.	p143
d. Expression des TLR par les sous-populations de cellules dendritiques OX62 spléniques.	p145
e. Fonctions des sous-populations des cellules dendritiques spléniques	

in vivo.	p147
<b>III.2. Identification et caractérisation d'une population de CPA ayant les caractéristiques des cellules dendritiques dites plasmacytoïdes ou IPC.</b>	<b>p153</b>
III.2.1. Article n°4 : Hubert et al. soumis pour publication.	p153
III.2.2. Discussion.	p200

## **DISCUSSION**

<b><u>I. La population de cellules dendritiques CD4<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>.</u></b>	<b>p205</b>
<b><u>II. La population de cellules dendritiques CD4<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>.</u></b>	<b>p216</b>
<b><u>III. La population de cellules dendritiques plasmacytoïdes CD4<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>.</u></b>	<b>p218</b>
<b><u>IV. Pourquoi existe-t-il plusieurs sous-populations de cellules Dendritiques ?</u></b>	<b>p220</b>

## **BIBLIOGRAPHIE**



## ABREVIATIONS

ADN: Acide DésoxyriboNucléique.

ARN: Acide RiboNucléique.

BMDC: Bone Marrow Dendritic Cell.

CD: Cluster differentiation.

CTL: Cytotoxic T Lymphocyte.

FLT3-L : FMS-like Tyrosine kinase 3 Ligand

G-CSF: Granulocyte Colony Stimulating Factor.

GM-CSF: Granulocyte-Monocyte Colony Stimulating Factor.

IFN: Interféron.

Ig: Immunoglobuline.

IL: InterLeukine.

LPS: LipoPolySaccharide.

NFkB: Facteur Nucléaire des chaînes légères des immunoglobulines.

NK: Cellule "Natural Killer".

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell.

Poly I:C: polyinosine-polycytidilique acid

RT/PCR: Transcription Inversée/Réaction de Polymérisation en Chaîne.

TCR: "T Cell Receptor".

TGF: "Tumor Growth Factor".

TLR: Toll Like Receptor

TNF: "Tumor Necrosis Factor".

## RESUME

Les DC (cellules dendritiques) sont des leucocytes qui jouent un rôle central dans le contrôle de la réponse immune. Notre équipe a montré dans un modèle de greffe cardiaque chez le rat que les DC du greffon pouvaient être responsables de la tolérance. Chez le rat, notre équipe a également mis en évidence que les DC spléniques cultivées étaient cytotoxiques contre des cellules tumorales. Les buts de cette étude ont été d'identifier et de caractériser les sous-populations de DC fraîches chez le rat et d'analyser les mécanismes et les rôles *in vivo* de la fonction cytotoxique des DC, ce qui constitue une première étape dans l'étude du rôle des DC dans l'induction de la tolérance. Nous avons mis en évidence plusieurs sous-populations de DC OX62<sup>+</sup> dans la rate et les ganglions, définies par l'expression du CD4. L'activité cytotoxique des DC est restreinte à la population CD4<sup>-</sup> et son mécanisme reste inconnu. Bien que non cytotoxique, nous avons également mis en évidence, dans la cavité péritonéale, une population de cellules aux caractéristiques de DC dans un modèle de vaccination anti-tumorale chez le rat. Les populations de DC spléniques CD4<sup>+</sup> et CD4<sup>-</sup> possèdent un phénotype et des fonctions différents. Les DC CD4<sup>-</sup> sont les principales productrices d'IL-12, induisent une réponse lymphocytaire Th1 mais stimulent faiblement les cellules TCD8. Les DC CD4<sup>+</sup> sont des stimulatrices puissantes de la prolifération des cellules T et induisent une réponse lymphocytaire Th1/Th2. Ces cellules expriment de grandes quantités de TLR 7, 8 et 9, cependant elles ne correspondent pas aux DC plasmacytoïdes (pDC). Ces dernières, que nous avons identifiées dans la rate, expriment le CD4 mais sont CD11b<sup>-</sup> et OX62<sup>-</sup>. Les pDC de rat se caractérisent, comme dans les autres espèces, par une forte production d'IFN $\alpha$  en réponse à une stimulation virale et par l'expression des TLR 7 et 9. Ces DC sont également capables de produire de l'IL-12 et induisent une réponse Th1 des cellules T CD4. Ces populations de DC pourraient avoir de multiples rôles notamment dans la tolérance et dans l'immunité anti-tumorale et permettent de faire un parallèle avec les populations de DC des autres espèces.

## ABSTRACT

Dendritic cells (DC) are leukocytes that play a central role in the control of the immune response. Our team showed, in a rat heart transplantation model, that DC in the graft could be responsible for tolerance. We also demonstrated that cultured rat splenic DC were cytotoxic against tumor cells. The aim of this work was to identify and characterize fresh DC subsets in the rat and to analyze the mechanisms and roles of their cytotoxic function *in vivo*, which would represent a first step in the comprehension of the role of DC in the induction of tolerance. We showed the existence of different subsets of OX62<sup>+</sup> DC in the spleen and lymph nodes, based on their expression of CD4. The cytotoxic activity was restricted to the CD4<sup>-</sup> DC subset and its mechanism remains unknown. Although they are not cytotoxic, we demonstrated the presence of a cell subset in the peritoneal cavity that displayed DC characteristics in a rat model of anti-tumoral vaccination. Splenic CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>-</sup> DC subsets have distinct phenotypes and functions. The CD4<sup>-</sup> DC are the main producers of IL-12 and induce a Th1 lymphocyte response, but are a poor stimulators of CD8 T cells. The CD4<sup>+</sup> DC are powerful stimulators of T cell proliferation and induce a Th1/Th2 lymphocyte response. These cells express large amounts of TLR 7, 8 and 9, however they are not equivalent to the plasmacytoid DC (pDC), which we have identified in the spleen. Plasmacytoid DC express CD4 but are CD11b<sup>-</sup> and OX62<sup>-</sup>. Rat pDC are characterized, as in other species, by their strong production of IFN $\alpha$  in response to viral stimulation and by the expression of TLR7 and 9. These DC can also produce IL12 and induce a Th1 response in CD4 T cells. These DC subsets could play multiples roles, especially in tolerance and in anti-tumoral immunity, and could enable parallels to be made with the DC subsets of other species.

# **INTRODUCTION**

## **I. Les cellules dendritiques : généralités.**

### **I.1 Historique.**

C'est Paul Langerhans qui, en 1868, décrit pour la première fois l'existence d'une population de cellules de morphologie irrégulière 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, puis qu'elles soient reconnues comme le « prototype » de cellules dendritiques (R.M. Steinman, 1991). Le terme « cellule dendritique » (DC<sup>1</sup> pour *dendritic cell*) fut introduit en 1973 par Ralph Steinman et Zanvil Cohn à la Rockefeller University (R.M. Steinman and Z.A. Cohn, 1973). Dans les années 60, 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 (F. Burnet, 1959). Cependant, cette activation lymphocytaire s'avérait difficile à mettre en œuvre *in vitro*, et il avait été constaté la nécessité d'une population de cellules dites accessoires. Les cellules accessoires étaient nécessaires à l'induction d'une réponse anticorps primaire *in vitro* par des lymphocytes spléniques. 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 permettant ainsi leur séparation par centrifugation sur un milieu dense. C'est en étudiant ces cellules accessoires que Ralph Steinman identifia une nouvelle population de leucocytes, différente des macrophages, et nommées DC en raison de leurs longs prolongements cytoplasmiques caractéristiques (R.M. Steinman, et al., 1975, R.M. Steinman and Z.A. Cohn, 1973, R.M. Steinman, et al., 1979). Outre ces caractères morphologiques, les DC étaient alors caractérisées par une forte mobilité, une faible activité endocytaire, une adhérence au plastique transitoire et une absence d'expression de récepteur

---

<sup>1</sup> Le terme DC plutôt que CD a été choisi afin d'éviter toute confusion avec le CD de cluster differentiation.

au fragment Fc des immunoglobulines (Ig) (R.M. Steinman, 1991). L'identification des DC comme principales cellules présentatrices de l'antigène aux lymphocytes T s'est longtemps heurtée à la rareté de ces cellules dans le sang et les tissus lymphoïdes (<1% de l'ensemble des cellules) et donc aux difficultés inhérentes de purification. Au cours de la dernière décennie, il est devenu possible d'obtenir de grandes quantités de DC *in vitro* à partir de progéniteurs médullaires et la description de molécules de surface spécifiquement exprimées par les DC a permis d'étudier avec précision ces cellules. De plus, la description des DC *in vivo* a révélé une hétérogénéité phénotypique. En fait, la famille des DC est constituée de différentes sous-populations. L'ensemble de ces cellules s'avère désormais fondamental dans le contrôle des réponses immunitaires (J. Banchereau and R.M. Steinman, 1998).

## **I.2. Fonctions principales des cellules dendritiques au cours de la réponse immunitaire.**

Pour comprendre le rôle unique joué par ces cellules il est nécessaire de resituer leur fonction principale au cours de la réponse immunitaire. Les DC sont les sentinelles du système immunitaire. Elles sont disséminées dans la plupart des tissus et organes et sont capables de détecter des signaux de danger tels qu'une infection. Elles jouent alors un rôle dans la réponse immunitaire innée. La réponse innée est la première ligne de défense mise en place par le système immunitaire contre les agents infectieux. Cette réaction immunitaire immédiate fait intervenir des cellules de type phagocytaire (macrophages, polynucléaires neutrophiles), des cellules cytotoxiques (cellules natural killer (NK)), et des molécules solubles telles les interférons (IFNs) et le complément. Les DC participent à la réponse innée en produisant des cytokines et chimiokines proinflammatoires et en phagocytant les pathogènes. Cependant, contrairement aux autres cellules de l'immunité innée, les DC ne meurent pas après avoir exercé ces fonctions et migrent dans les organes lymphoïdes pour

assumer leur principale fonction : la présentation des antigènes aux lymphocytes T. Les DC jouent un rôle essentiel dans l'initiation de la réponse adaptative. En effet, pour être reconnu par le lymphocyte T, l'antigène doit être apprêté par les cellules dites présentatrices de l'antigène (CPA). Il existe trois types de CPA : les macrophages, les lymphocytes B et les 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 seule fonction connue des DC matures. De plus, contrairement à toutes les CPA qui peuvent activer des cellules T activées ou mémoires, seules les DC sont capables de stimuler des lymphocytes T naïfs (J. Banchereau and R.M. Steinman, 1998). Ceci est une caractéristique majeure des DC matures qui sont donc essentielles à l'initiation de la réponse immunitaire adaptative contre un antigène nouveau. Elles méritent donc le nom de « CPA professionnelles » (P. Matzinger, 1994).

Pour assumer ces fonctions dans la réponse innée et adaptative, les DC existent sous deux formes : mature et immature dont les fonctions respectives sont séparées dans le temps et dans l'espace. Les DC immatures sont présentes dans les tissus où elles capturent l'antigène. La migration des DC vers les organes lymphoïdes s'accompagne d'une maturation des DC en présence de signaux de danger du micro-environnement. Dans les organes lymphoïdes secondaires les DC matures ont la fonction principale de présenter l'antigène aux lymphocytes T. Ces deux états de maturation confèrent une grande plasticité aux DC et la maturation est une étape clef dans l'initiation de la réponse immunitaire.

### **I.3. La diversité des cellules dendritiques.**

#### **I.3.1. Les sous-populations de cellules dendritiques.**

L'étude des DC a révélé l'existence de plusieurs sous-populations de DC fonctionnellement différentes qui contribuent largement à la plasticité de ces cellules.

L'hétérogénéité des DC est déterminée par plusieurs facteurs: leur localisation, leur stade de maturation, et leur ontogénèse. Sur cette base, différentes sous-populations de DC ont été déterminées chez l'homme et la souris et sont résumées dans le tableau 1

Chez l'homme ce sont essentiellement les DC du sang ou les DC générées *in vitro* à partir de précurseurs sanguins qui ont été caractérisées. Chez la souris, les DC des organes lymphoïdes ont largement été étudiées.

<b>Localisation</b>	<b>Précurseurs de DC</b>	<b>DC immatures</b>
<b>HOMME</b>		
Sang	<b>pré-DC2</b> CD11c- CD1a- IL-3R+ <b>monocytes</b> CD11c+ CD1a+	<b>DC plasmacytoïde (DC2)</b> DC CD11c+
Tissu		<b>Cellule de Langerhans</b> CD11c+ CD1a+ IL-3R- <b>DC interstitielle</b> CD11c+ CD1a- IL-3R-
<b>SOURIS</b>		
Sang	<b>pré-DC2</b> CD8- CD4+ IL3R- <b>monocytes</b> CD11c+	<b>DC plasmacytoïde (DC2)</b> CD8- CD4+ IL3R-
Organes lymphoïdes	<b>pré-DC2</b> CD8- CD4+ IL3R-	<b>DC plasmacytoïde (DC2)</b> CD8- CD4+ IL3R- B220+ <b>DC</b> CD4+ CD8- B220- <b>DC</b> CD4- CD8+ B220- <b>DC</b> CD4- CD8- B220-
Tissu		<b>DC de Langerhans</b> CD11c+ CD4+ Langerin+

**Tableau 1** : Les différentes sous-populations de DC décrites chez l'homme et chez la souris.

Ces sous-populations de DC seront étudiées plus en détail dans le paragraphe VII.

### I.3.2. La localisation des cellules dendritiques.

La localisation des DC permet de comprendre comment elles s'organisent pour induire une réponse adaptative et innée au cours d'une infection. Les différentes populations de DC décrites dans ce paragraphe regroupent par localisation les sous-populations que nous étudierons plus loin et seront donc brièvement décrites ici.



#### a. Les cellules dendritiques des tissus.

On trouve des DC dans les tissus en contact avec les antigènes comme la peau et les muqueuses. Les DC de l'épiderme, ou cellules de Langerhans, forment un réseau particulier de cellules dans l'épiderme, lieu privilégié pour la surveillance immunologique (N. Romani, et al., 2001). Le derme contient également des DC qui s'apparentent aux DC interstitielles que l'on retrouve dans les autres organes (C. Caux, et al., 1996). Les muqueuses des tractus digestifs, respiratoires et génitaux, contiennent un réseau des DC immatures ressemblant aux cellules de Langerhans. Il est intéressant de noter qu'un réseau de DC a également été récemment mis en évidence au sein de l'intima des vaisseaux artériels et veineux. La fonction des ces DC vasculaires est encore inconnue (G. Millonig, et al., 2001).

A l'exception de quelques organes dits de privilège immunologique comme la cornée centrale et le parenchyme cérébral, tous les tissus non lymphoïdes contiennent, en très faible quantité, des DC. Ces DC qui colonisent les tissus par voie hématogène sont dites DC interstitielles et leur abondance peut varier d'un organe à un autre mais ne dépasse pas 1% de l'ensemble des cellules (B. Steiniger, et al., 1984).

#### b. Les cellules dendritiques des organes lymphoïdes.

Les DC représentent 0.5 à 2 % des cellules des organes lymphoïdes. 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 (R.M. Steinman, et al., 1997). Dans le thymus, les DC se localisent dans la médullaire et surtout à la jonction cortico-médullaire (K. Inaba, et al., 1994) et jouent un rôle majeur dans la sélection négative des thymocytes (T. Brocker, et al., 1997). Des DC sont également présentes dans la zone marginale de la rate, ainsi que dans le cortex inter

folliculaire des ganglions lymphatiques (K. Inaba, et al., 1994). Les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (amygdales, plaques de Peyer) contiennent également des DC.

c. Les cellules dendritiques de la lymphe et du sang.

La lymphe circulant des tissus périphériques vers les ganglions lymphatiques drainant contient des cellules ayant toutes les caractéristiques des DC et qui ont un aspect voilé en microscopie (*veiled cells*). Ces cellules vont se localiser dans les zones T des ganglions lymphatiques et vont probablement y mourir après quelques jours car on ne retrouve pas de DC dans la lymphe efférente qui contient essentiellement des cellules T naïves (M. Haig, et al., 1999). Les DC rencontrées dans le sang représentent seulement 0,1% de l'ensemble des PBMC et de 1 à 2 % des cellules mononucléées. Il s'agit de précurseurs immédiats des DC ou de cellules dendritiques immatures.

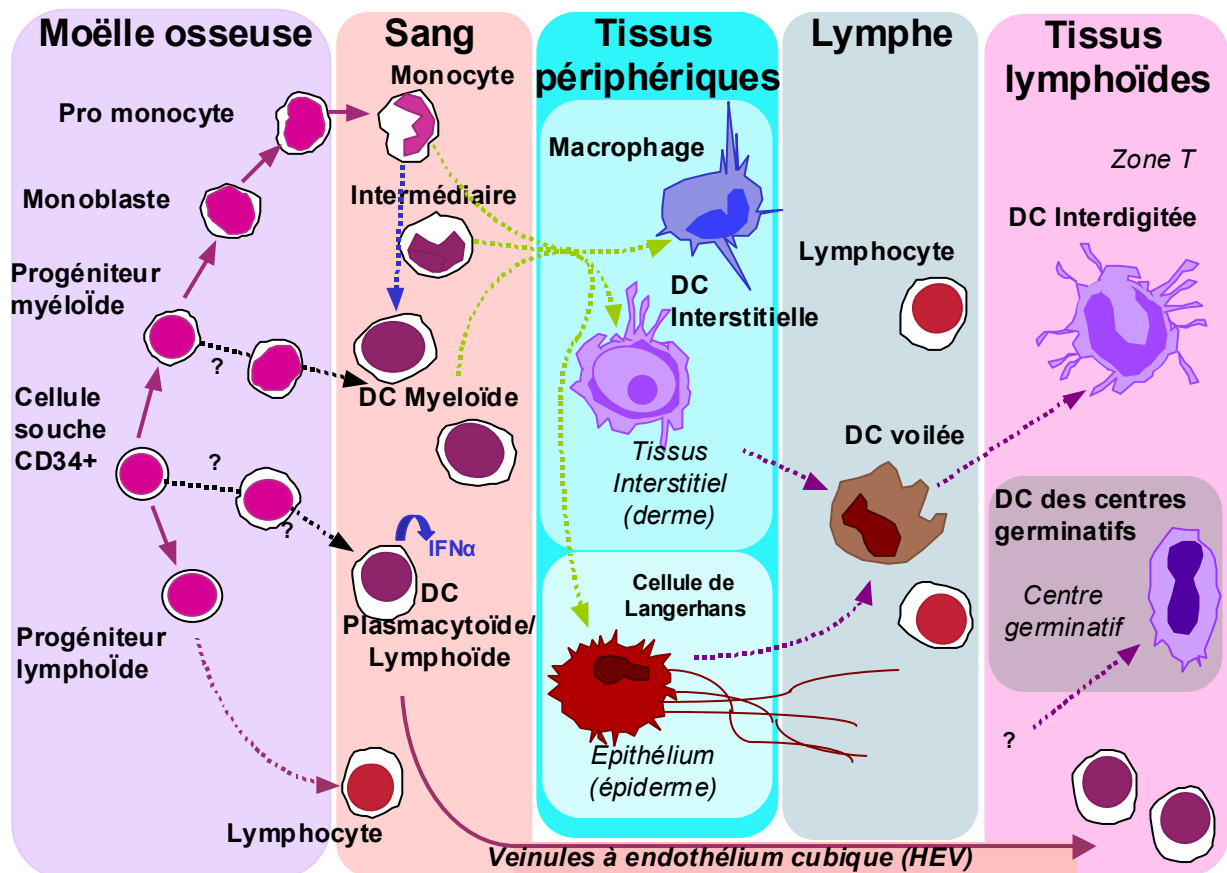


Schéma 1: Cycle de vie des cellules dendritiques.

La localisation des DC reflète particulièrement leur cycle de vie, leurs fonctions et leur diversité (schéma 1). Nous verrons comment les DC exercent leur plasticité en évoluant d'un stade immature, où leur fonction est la capture de l'antigène, à un stade mature, où elles présentent cet antigène aux cellules T. Nous verrons également comment la maturation des DC permet le contrôle de la réponse immunitaire. L'ontogénie des DC reste encore assez mal connue et controversée. Cependant, des travaux récents montrent l'existence de différentes sous-populations de DC dans différentes espèces dont nous étudierons les fonctions, les relations et la plasticité. Outre leur capacité à induire la réponse primaire des cellules T, le rôle des DC a également été montré dans la tolérance au soi centrale et périphérique.

## **II. Ontogénie des cellules dendritiques.**

Les DC, comme de nombreuses cellules du système immunitaire, sont continuellement produites dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques. Leur croissance et leur différenciation requièrent des facteurs tel que le FLT3-L (B. Pulendran, et al., 2000), le  $TNF\alpha$ , le GM-CSF (C. Caux, et al., 1996) et, dans une moindre mesure, le G-CSF (B. Pulendran, et al., 2001a). Les mécanismes et les étapes de différenciation des DC à partir de leurs progéniteurs médullaires ne sont pas encore totalement connus, cependant il semble exister deux voies de développement différentes, myéloïde et lymphoïde.

En effet, chez l'homme comme chez la souris, on distingue des DC dites «lymphoïdes» et des DC dites «myéloïdes». Il faut cependant noter que les arguments pour une origine lymphoïde de certaines DC, bien que nombreux, restent indirects. Ces deux populations diffèrent par leurs marqueurs membranaires et les facteurs de croissance nécessaires à leur différenciation mais dérivent d'une cellule souche commune CD34+.

## II.1.Ontogénie des cellules dendritiques chez l'homme.

Chez l'homme, cette cellule souche hématopoïétique CD34<sup>+</sup> se différencie dans la moelle osseuse en précurseur lymphoïde (*common lymphoid progenitor*, CLP) et en précurseur myéloïde (*common myeloïd progenitor*, CMP) qui sera également à l'origine des polynucléaires neutrophiles, des macrophages, et des mégacaryocytes (K. Akashi, et al., 2000). Les voies de différenciation du précurseur myéloïde sont les mieux connues (R.M. Steinman and K. Inaba, 1999). Néanmoins, ces voies de différenciation ont été étudiées *in vitro* et la situation *in vivo* est largement inconnue. En présence de GM-CSF et le TNF $\alpha$ , le CMP peut se différencier selon deux voies en cellule CD14<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup> et CD1a<sup>+</sup> ou en cellule CD14<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup> et CD1a<sup>-</sup> (C. Caux, et al., 1997). A partir de ce stade, l'activité de prolifération cesse. Sous l'action du GM-CSF et de l'IL-4, le précurseur CD14<sup>+</sup> se différencie en DC immature dont l'équivalent *in vivo* est la DC interstitielle (Birbeck<sup>-</sup>, CD1a<sup>-</sup>, facteur XIIIa<sup>+</sup>) et migre dans les tissus (C. Caux, et al., 1997), tandis que sous l'action du GM-CSF, de l'IL-4 et du TGF $\beta$ , le précurseur CD14<sup>-</sup> se différencie en cellule de Langerhans (Birbeck<sup>+</sup>, CD1a<sup>+</sup>, facteur de coagulation XIIIa<sup>-</sup>) qui constituent les DC de la peau *in vivo*. Les cellules de Langerhans représentent donc une voie particulière de différenciation des DC, bien qu'initialement commune avec les DC myéloïdes (C. Caux, et al., 1996). Le précurseur CD14<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup>, CD1a<sup>+</sup> exprime également la molécule CLA (*Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen*) qui permet probablement son recrutement dans l'épiderme, où est exprimé le récepteur de ce ligand (E-selectine) (N. Yasaka, et al., 1996). Le TGF $\beta$  est un facteur indispensable de différenciation des cellules de Langerhans mais pas des DC interstitielles à la fois chez l'homme et chez la souris (T.A. Borkowski, et al., 1996, H. Strobl, et al., 1997). Ces deux types de DC étant présents dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes de nouveau nés, il semble que leur production et leur diversification à partir de leurs cellules souches soient indépendantes des pathogènes (Y.J. Liu, 2001).

Dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes, sont présentes des DC appelées GCDC (*Germinal Center Dendritic Cell*) (G. Grouard, et al., 1996). Ces cellules ont un phénotype similaire aux DC myéloïdes et pourraient dériver des DC interstitielles qui auraient migré dans les follicules lymphoïdes. Cependant, ces résultats concernant une population de GCDC n'ont pas été reproduits par d'autres équipes.

En plus des deux populations de DC interstitielles et de Langerhans, la cellule souche hématopoïétique est à l'origine de deux autres précurseurs immédiats de DC que l'on retrouve dans le sang : un myéloïde qui correspond au monocyte (parfois appelé pré-DC1) et un lymphoïde qui correspond aux DC plasmacytoïdes (pré-DC2 ou pDC) (Y.J. Liu, et al., 2001). Le monocyte, qui exprime le CD14, est un précurseur immédiat des DC myéloïdes et probablement des DC interstitielles *in vivo*, (F. Sallusto and A. Lanzavecchia, 1994). Les précurseurs de DC retrouvés dans le sang, sont très différents des DC immatures. Ils ont une faible expression de molécules de costimulation, une faible mobilité, une faible capacité de stimulation des lymphocytes T *in vitro* et semblent directement impliqués dans l'immunité innée. De plus, les monocytes et les pDC ont des propriétés différentes que l'on détaillera dans le paragraphe VII : les monocytes expriment des antigènes de type myéloïde tels que le CD11b, le CD11c, le CD13, le CD14 et le CD33, tandis que les pDC sont CD14<sup>-</sup> et CD11c<sup>-</sup> et expriment des molécules spécifiques des lymphocytes.

*In vitro*, les monocytes humains se différencient en 5 jours sous l'action du GM-CSF et d'IL-4 en DC myéloïdes immatures exprimant CD11c<sup>+</sup> (F. Sallusto and A. Lanzavecchia, 1994), dites DC1 (M.C. Rissoan, et al., 1999) et peuvent se différencier en macrophage sous l'action du M-CSF (C. Caux, et al., 1996). Ceci montre la plasticité du monocyte qui peut se différencier en DC ou en macrophage selon le micro-environnement local. Cette voie de différenciation des monocytes en DC existe probablement *in vivo*. En effet, il a été montré chez la souris que, *in vivo*, des monocytes peuvent se différencier rapidement (48h) en DC

après phagocytose dans les tissus (G.J. Randolph, et al., 1999). Le début de différenciation des monocytes est probablement déclenché *in vivo* par la traversée de l'endothélium vasculaire comme lors de l'entrée dans les canaux lymphatiques tandis que les monocytes qui restent dans les tissus se différencient en macrophages (G.J. Randolph, et al., 1998). De plus, l'IL-6 a un effet inhibiteur sur la différenciation des monocytes en DC et favorise la différenciation en macrophages (P. Chomarat, et al., 2000).

Les DC, dites DC2, issues des pDC ont une morphologie de type plasmacytoïde et ont longtemps été appelées lymphocytes T plasmacytoïdes du fait de leur profil d'expression membranaire (G. Grouard, et al., 1997).

## **II.2. Ontogénie des cellules dendritiques chez la souris.**

Chez la souris, différentes origines hématopoïétiques des DC ont été suggérées en particulier pour les DC CD8<sup>+</sup> thymiques et pour les DC CD8<sup>+</sup> et CD8<sup>-</sup> spléniques qui sont fonctionnellement différentes.

Les DC thymiques CD8<sup>+</sup> ont été décrites comme des DC lymphoïdes du fait de l'expression de marqueurs communs entre les cellules proT et les DC (Sca-1, Sca-2) (C. Ardavin, 1997) et de leur différenciation simultanée aux cellules T, à partir du précurseur commun lymphoïde (C. Ardavin, et al., 1993, K. Shortman, 2000). Au contraire, dans la rate, les DC CD8<sup>-</sup> spléniques dériveraient du précurseur myéloïde commun (CMP) sous l'action du GM-CSF (K. Inaba, et al., 1992) et les DC CD8<sup>+</sup>, par analogie aux DC thymiques, ont été considérées comme d'origine lymphoïde. Ces résultats étaient d'autant plus intéressants que les populations de DC CD8<sup>+</sup> et CD8<sup>-</sup> possèdent des fonctions très différentes. Cependant, il a été récemment montré que le CLP et le CMP pouvaient engendrer les deux types de DC CD8<sup>+</sup> et CD8<sup>-</sup> spléniques et thymiques (L. Wu, et al., 2001). De plus, les DC CD8<sup>-</sup> peuvent acquérir l'expression du CD8 et d'autres marqueurs spécifiques aux DC CD8<sup>+</sup> après transfert, ce qui

suggère que les DC CD8<sup>+</sup> et CD8<sup>-</sup> dans la rate représentent deux stades de maturation différents d'une même population de cellules (G.M. del Hoyo, et al., 2002). Ces résultats ont été récemment contestés par Naik et al. qui ont montré que les précurseurs des DC CD8<sup>+</sup> ne sont pas les DC CD8<sup>-</sup>, mais des cellules n'ayant pas des caractéristiques de DC matures et donc difficilement isolables (S. Naik, et al., 2003). L'expression du CD8 sur les DC chez la souris ne définit donc pas l'origine lymphoïde des DC, mais permet de séparer des populations aux fonctions différentes. Toutefois, l'étude de souris déficientes de certains gènes a montré que le développement des deux sous-populations de DC CD8<sup>+</sup> et CD8<sup>-</sup> spléniques est dépendant de facteurs de transcription différents. En effet, les souris RelB <sup>-/-</sup> n'ont pas de DC spléniques CD8<sup>-</sup> (L. Wu, et al., 1998) tandis que dans des souris ICSBP <sup>-/-</sup> (*IFN consensus sequence binding protein*) on observe l'absence de pDC et une forte diminution des DC spléniques CD8<sup>+</sup> (G. Schiavoni, et al., 2002). Récemment, il a également été mis en évidence que le facteur de transcription Id2, qui joue un rôle dans le développement des lymphocytes B et des cellules NK, était nécessaire au développement des cellules de Langerhans et des DC CD8<sup>+</sup>. De plus, l'expression d'Id2 semble être induite par le TGFβ, cytokine nécessaire pour induire la différenciation des cellules de Langerhans *in vitro* (C. Hacker, et al., 2003). Différents facteurs de transcription apparaissent donc comme complémentaires dans le contrôle du développement des sous-populations de DC, ce qui suggère différentes voies de développement pour chaque sous-population de DC.

Récemment, il a été identifié un précurseur commun à toutes les DC chez la souris (G.M. del Hoyo, et al., 2002). Cependant, son appartenance à la lignée lymphoïde ou myéloïde n'a pas été déterminée et il pourrait dériver d'un précurseur commun lymphoïde/myéloïde. Chez la souris, les DC plasmacytoïdes ont été récemment identifiées (C. Asselin-Paturel, et al., 2001). Bien qu'elles diffèrent par leur phénotype et par certaines fonctions de celles identifiées chez l'homme, elles possèdent la même caractéristique de

produire de grandes quantités d'IFN $\alpha$  en réponse à une stimulation virale (C. Asselin-Paturel, et al., 2001). L'origine, myéloïde ou lymphoïde des pDC, n'est pas encore connue mais elles dérivent du précurseur commun à toutes les DC (G.M. del Hoyo, et al., 2002). De la même manière que chez l'homme, le FLT3-L entraîne le développement des pDC à partir des cellules souches de la moelle osseuse tandis que le GM-CSF, facteur de croissance des cellules myéloïdes, bloque complètement le développement de ces cellules *in vitro* (B. Blom, et al., 2000, M. Gilliet, et al., 2002). Il semble donc que malgré quelques différences phénotypiques et fonctionnelles entre les pDC chez l'homme et chez la souris, leur voie de développement soit conservée.

### **II.3. Les arguments pour un développement lymphoïde des cellules dendritiques plasmacytoïdes**

Les preuves d'un développement lymphoïde des pDC chez l'homme et chez la souris sont indirectes. L'hypothèse d'une origine lymphoïde des DC a été suscitée par des travaux montrant que les DC murines pouvaient dériver d'un précurseur commun aux cellules T, B et NK (C. 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. Chez l'homme, l'origine lymphoïde des pDC est attribuée au fait qu'elles expriment des gènes exprimés uniquement dans les cellules T et B en développement comme le pT $\alpha$  (pre T-cell receptor  $\alpha$ ), et le SpiB (P.C. Res, et al., 1999) (N. Bendriss-Vermare, et al., 2001). De plus, il a également été montré que la sur-expression des facteurs dominants négatifs Id2 et Id3 bloque le développement des pDC comme celui des cellules T et des cellules B mais pas celui des DC myéloïdes (H. Spits, et al., 2000). Il semble donc que les pDC sont plus proches des lymphocytes B et T que des DC myéloïdes. Cette origine lymphoïde des pDC est cependant controversée et il a été montré, par exemple, que les DC plasmacytoïdes du thymus



peuvent se développer dans des souris KO pour les facteurs Notch 1 et *T cell factor 1* essentiels dans le développement des cellules T (I. Ferrero, et al., 2002). Il est donc possible que les pDC possèdent une voie originale de développement à partir d'un précurseur lymphoïde qui se distinguerait de manière précoce de la voie de développement des lymphocytes.

Les différentes sous-populations de DC ont une origine myéloïde ou lymphoïde encore mal définie. Cependant, quelle que soit leur ontogénie, elles possèdent des caractéristiques et des fonctions différentes que l'on étudiera.

### **III. Fonctions des cellules dendritiques immatures.**

La possibilité de dériver des DC *in vitro* en grande quantité à partir de précurseurs médullaires ou de monocytes circulants a permis depuis une dizaine d'année d'étudier et de comprendre les fonctions des DC. Néanmoins, dans l'immense majorité des cas, les DC ainsi étudiées sont des DC myéloïdes et l'identification et les fonctions des DC dites lymphoïdes ne sont connues que depuis quelques années. Les fonctions des DC immatures et matures décrites ci-dessous correspondent donc essentiellement aux DC myéloïdes. Les fonctions de capture antigénique et de présentation antigénique sont séparées dans le temps et dans l'espace. Les DC immatures dans les tissus sont des sentinelles spécialisées dans la capture antigénique et l'apprêtement alors que les DC matures dans les zones T des organes lymphoïdes sont spécialisées dans la présentation de complexes CMH / peptide aux cellules T et l'initiation de la réponse immune.

### **III.1. La capture antigénique par les cellules dendritiques immatures.**

#### III.1.1. Mécanisme de capture antigénique par les cellules dendritiques.

Les DC immatures sont non seulement localisées de façon optimale pour rencontrer les antigènes dans l'ensemble des tissus non lymphoïdes mais elles ont également développé de multiples mécanismes de capture antigénique. Dans les tissus, les DC capturent des pathogènes, des cellules infectées, des cellules mortes ou leurs produits dans le but de les présenter aux lymphocytes T. La capture de l'antigène en elle seule ne suffit pas pour entraîner l'activation et la maturation des DC et la maturation est en fait contrôlée par la présence des signaux de dangers. Toutefois en présence d'un pathogène les antigènes pathogéniques sont capturées et les signaux dits de danger du micro-environnement induisent la maturation de DC, ce qui permet alors une présentation efficace des antigènes pathogéniques aux lymphocytes T. D'autre part, les pathogènes peuvent utiliser les mécanismes de capture de l'antigène chez les DC comme voie d'entrée pour une infection (T.B. Geijtenbeek, et al., 2000)

L'*endocytose* permet la capture de macromolécules par l'intermédiaire de récepteurs situés dans des régions spécialisées de la membrane plasmique appelées puits recouverts. L'endocytose est déclenchée par la fixation d'antigènes sur ces récepteurs membranaires qui, via leur partie intracytoplasmique, permettent le recrutement d'un réseau de clathrines qui favorise le développement d'une dépression puis d'une structure vésiculaire (V.I. Slepnev and P. De Camilli, 2000). Les récepteurs d'endocytose peuvent appartenir à différentes familles : famille de récepteurs de type lectine (DEC-205, récepteur au mannose) ou de récepteurs de type I et II au fragment Fc des IgG (CD32, CD64). Ces récepteurs sont spécifiquement exprimés sur des sous-populations de DC immatures.

Les particules et les antigènes solubles peuvent être internalisés par *phagocytose* et *macropinocytose*. Ces deux processus sont dépendant de l'actine et résultent en la formation de larges vacuoles intracellulaires. La macropinocytose (vésicule de pinocytose de 0,25 à 1  $\mu\text{m}$ ) est constitutive dans les DC immatures (F. Sallusto, et al., 1995) et permet de «filtrer» les liquides extra-cellulaires et de capturer des protéines solubles même si elles sont présentes en très faible quantité. La macropinocytose est diminuée au cours de la maturation des DC.

La phagocytose de particules se fait généralement via un récepteur qui peut être identique aux récepteurs d'endocytose. Elle permet de capturer toutes les sortes de bactéries gram<sup>+</sup> et gram<sup>-</sup> ainsi que les mycobactéries (D. Bell, et al., 1999). Les DC capturent également, via la phagocytose, des levures et des parasites. De plus, la phagocytose permet la capture de particules non infectieuses comme les cellules mortes. Les DC dérivées des monocytes humains, par exemple, capturent par phagocytose des corps apoptotiques et nécrotiques provenant de lymphocytes T et B (M.L. Albert, et al., 1998b). La phagocytose par les DC dépend parfois de récepteurs spécifiques comme la chaîne  $\alpha_v$  des intégrines et le CD36 pour les cellules apoptotiques (M.L. Albert, et al., 1998a).

De plus, certains virus (HIV, virus de la rougeole) peuvent directement infecter les DC. Cependant, ceci entraîne souvent une dégradation de la fonction des DC en altérant la présentation des antigènes sur le CMH I et la migration des DC comme montré pour le virus de l'Herpes (M. Salio, et al., 1999).

### III.1.2. Les récepteurs de capture de l'antigène sur les DC.

Il existe de nombreux types de récepteurs sur les DC (Tableau 2). Les récepteurs de capture de l'antigène reconnaissent des motifs liés aux pathogènes et permettent à la DC de les discriminer. Ces récepteurs interviennent dans des phénomènes de phagocytose ou d'endocytose et permettent aux DC l'apprêtement et la présentation des peptides antigéniques.

Ces récepteurs font essentiellement partie de la famille des lectines de type C (dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$ ). Comme on le verra plus loin, d'autres récepteurs spécifiques permettent la reconnaissance des signaux de dangers et induisent la maturation des DC (TLR).

a. Les récepteurs de la famille des lectines de type C.

Les récepteurs de la famille des lectines de type C reconnaissent des antigènes mannosylés et le galactose (K. Drickamer, 1999). Néanmoins, les ligands spécifiques de ces récepteurs ne sont pas encore connus. Le MMR (*Macrophage mannose receptor*) fonctionne comme un récepteur endocytaire à la surface des DC et est constitutivement internalisé et recyclé, son ligand étant libéré dans des endosomes précoces (F. Sallusto, et al., 1995). Le MMR permet une internalisation importante d'antigènes qui sont ensuite présentés par la DC (F. Sallusto, et al., 1995). Au contraire le DEC205 (CD205) est internalisé après la capture de son ligand qui est ensuite libéré dans les endosomes tardifs et les lysosomes, où il est dégradé (C.G. Figdor, et al., 2002). Le DEC205 est ensuite recyclé (K. Mahnke, et al., 2000). Ceci suggère qu'il initie une voie différente d'endocytose par récepteurs via les endosomes tardifs, ce qui entraîne une meilleure présentation des antigènes (K. Mahnke, et al., 2000). Le récepteur DC-SIGN (*Dendritic cell-specific ICAM3-grabbing nonintegrin*) permet également la capture des antigènes par les DC. Contrairement au DEC205 qui semble associé à un phénotype de DC mature, l'expression de DC-SIGN et du MMR diminue au cours de la maturation des DC (M. Kato, et al., 2000). De manière intéressante, il a été récemment montré que le BDCA-2, une lectine exprimée par les DC plasmacytoïdes pouvait lier des antigènes qui sont rapidement internalisés, dégradés et présentés aux lymphocytes T (A. Dzionek, et al., 2001). La langerin est également spécifique d'une population de DC, les cellules de Langerhans. Elle est internalisée instantanément à 37°C et se localise ensuite dans les granules de Birbeck spécifiques de ces cellules (J. Valladeau, et al., 2000). Cependant, elle

n'est pas associée aux molécules de CMH de classe II dans ces granules et ne semble pas impliquée dans la présentation par le CMH de classe I. Il est possible qu'elle intervienne dans le transport des antigènes exogènes vers le CMH de classe I au cours de la présentation croisée. D'autres lectines ont été identifiées plus récemment sur les DC mais ces récepteurs ont été peu étudiés : Dectin 1 et 2 (*DC associated Ctype lectins 1-2*) (K. Ariizumi, et al., 2000), CLEC1 (*c-type lectin receptor 1*) (M. Colonna, et al., 2000), DCIR (*DC immunoreceptor*) (E.E. Bates, et al., 1999) et LLIR (*lectin like immunoreceptor*) (X. Huang, et al., 2001). Il faut noter que DCIR et LLIR possèdent des motifs ITIM tandis que dectin 1, un motif ITAM. De plus, CLEC1 est homologue aux récepteurs de type NK (C.G. Figdor, et al., 2002).

<b>Lectine de type C</b>	<b>Production</b>	<b>Ligand</b>	<b>Fonction</b>
MMR (CD206)	DC, Leucocytes Monocytes	Mannose, fucose sLeX	Capture de l'Ag
DEC-205 (CD205)	DC, Leucocytes DC Activées	?	Capture de l'Ag
Langerine (CD207)	Leucocytes	?	Formation de granules
DC-SIGN (CD209)	DC	HIV-1(gp120) SIV, mannan ICAM-2, ICAM-3	Interaction avec les cellules T, Capture de l'Ag, pathologie
BDCA-2	DC plasmacytoïdes	?	?
DCIR (LLIR)	DC, Monocytes	?	?
CLEC-1	DC	?	?
<b>Autres</b>			
Fc $\gamma$ RI (CD64) Fc $\gamma$ RII (CD32) Fc $\gamma$ RIII (CD16)	DC	Complexe immunologique	Captures de l'Ag
Intégrines $\alpha\upsilon\beta$ $\alpha\upsilon\beta$	DC	Cellules mortes	Capture de l'Ag
Récepteur "Scavenger" (CD36)	DC	Cellules mortes	Capture de l'Ag

**Tableau 2 :** Les récepteurs de capture de l'antigène exprimés par les cellules dendritiques, modifié d'après C.G. Figdor, et al., 2002.

#### b. Les autres récepteurs de capture de l'antigène.

Il existe également des récepteurs moins spécifiques aux DC qui permettent la présentation d'antigènes: les récepteurs Fc $\gamma$  aux immunoglobulines captent les complexes immuns (A. Regnault, et al., 1999). Il existe trois types de récepteurs : Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RIIa (CD32) et le Fc $\gamma$ R III (CD16) (M.E. Esposito-Farese, et al., 1995, N.A. Fanger, et al., 1996). Il a été montré récemment que le Fc $\gamma$ RI et le Fc $\gamma$ RIIa sont impliqués dans la phagocytose des érythrocytes infectés par *plasmodium falciparum* (A.E. Tebo, et al., 2002). Les intégrines  $\alpha$ V $\beta$ 5 et  $\alpha$ V $\beta$ 3 captent les cellules mortes (M.L. Albert, et al., 1998a). Ces récepteurs ont la particularité d'engendrer une présentation croisée des antigènes sur le CMH de classe I. Il a également été décrit sur les DC un seul récepteur *scavenger*, le CD36 qui est impliqué dans la capture de corps apoptotiques (N. Platt, et al., 1998).

### **III.2.Chargement des peptides sur les molécules du CMH.**

#### III.2.1. Molécules de CMH de classe II.

Les particules antigéniques, capturées par phagocytose, et les antigènes solubles capturés par macropinocytose ou par endocytose médiée par un récepteur, sont présentées sur les molécules de CMH de classe II de la DC (schéma 2). Ces antigènes sont dégradés dans la voie endocytique puis sont acheminés vers des compartiments spécialisés, riches en molécules de CMH de classe II (H.W. Nijman, et al., 1995). Ces compartiments appelés MIIC (*MHC class II rich compartments*) correspondent probablement à la fusion d'endosomes tardifs avec des vésicules riches en molécules de CMH de classe II et d'HLA DM, provenant du reticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. Ce type de compartiment est caractéristique des cellules de Langerhans et des DC immatures générées *in vitro*, et correspond au lieu de chargement des peptides sur les molécules de CMH de classe II (H.W. Nijman, et al., 1995).

Les DC immatures synthétisent de grandes quantités de molécules de CMH de classe II qui restent majoritairement intracellulaires et dont la demi-vie est très courte. Dans ces compartiments, les chaînes  $\alpha\beta$  du CMH de classe II sont associées à une chaîne invariante qui bloque l'association de peptides (P. Cresswell, 1996). Dans la DC immature, les antigènes et les macromolécules accèdent au MIIC pré-lysosomal où s'accumule le complexe CMH classe II/chaine invariante. Lors de la maturation, la cathepsine permet le clivage de la chaîne invariante et le HLA DM catalyse l'association de la molécule de CMH de classe II et du peptide (P. Pierre and I. Mellman, 1998). Dans la DC immature, la cathepsine est en permanence inhibée par la cystatin C qui est ensuite régulée négativement lors de la maturation (P. Pierre and I. Mellman, 1998). Les signaux de maturation entraînent donc la synthèse de molécules de CMH de classe II et l'exportation du complexe CMH/peptide à la membrane de manière très importante (M. Cella, et al., 1997). Ces complexes restent stables pendant plusieurs jours, permettant ainsi leur présentation ultérieure aux lymphocytes T dans les organes lymphoïdes (K. Inaba, et al., 1997). Le DC LAMP, un nouveau marqueur exclusivement induit dans les DC matures, apparaît dans les lysosomes et dans les MIIC immédiatement avant la translocation des complexes CMH de classe II peptides à la membrane cellulaire, ce qui est coordonné avec la maturation des DC (B. de Saint-Vis, et al., 1998). Les différentes voies d'endocytose et de protéolyse des antigènes capturés par les DC déterminent la nature du peptide présenté par les CMH de classe II (E.A. Butz and M.J. Bevan, 1998). Ces variations dans l'apprêtement de l'antigène pourraient permettre le recrutement de cellules T CD4 possédant diverses spécificités de TCR et l'expansion de la réponse immune.

### III.2.2. Molécules de CMH de classe I.

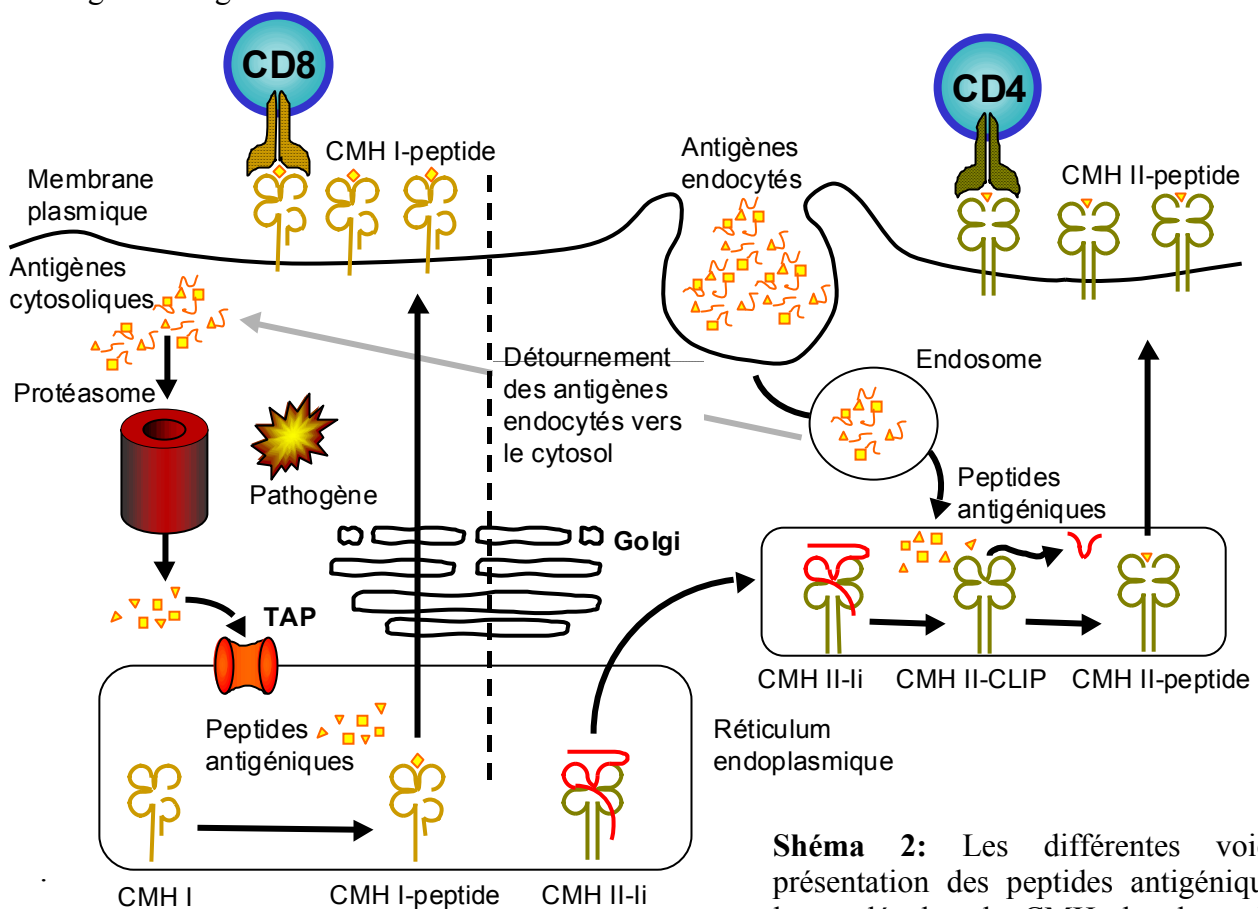
La fonction classique des molécules de CMH de classe I est l'apprêtement des peptides dits endogènes (E. Pamer and P. Cresswell, 1998) (schéma 2). Les molécules de CMH de classe I étant présentes sur toutes les cellules nucléées, la présentation de peptides endogènes n'est donc pas réservée aux CPA. Cependant, les DC, pour induire des cellules T cytotoxiques, peuvent présenter sur leurs classe I des peptides antigéniques endogènes et exogènes. Classiquement, les protéines du cytosol après ubiquitination sont dégradées dans le protéasome (complexe protéasique multicatalytique) puis transportées dans le reticulum endoplasmique via les transporteurs TAP1 et TAP2 de manière ATP dépendante. Dans le réticulum les peptides de 8 à 10 mers sont associés aux molécules de CMH de classe I. Ces peptides peuvent également avoir une origine virale après infection des DC (J. Banchereau, et al., 2000).

### IV.2.3. La présentation croisée.

La voie de présentation des peptides exogènes sur les molécules de CMH I est appelée présentation croisée (*cross-presentation*). Elle fut décrite il y a une vingtaine d'année par le groupe de Bevan qui avait alors montré la génération de CTL contre des antigènes d'histocompatibilité mineurs exprimés par des cellules allogéniques transplantées (M.J. Bevan, 1976). Il existe deux mécanismes de présentation des peptides exogènes sur le CMH I, une voie indépendante de TAP dans laquelle les antigènes sont directement dégradés dans les endosomes (J.D. Pfeifer, et al., 1993) et une voie dépendante des protéines TAP dans laquelle les antigènes migrent du phagosome au cytosol (M. Kovacovics-Bankowski, et al., 1993) (schéma 2). Cette voie de présentation croisée est particulièrement efficace dans les DC et semble impliquée dans la présentation de nombreux antigènes. Cette voie de présentation a été essentiellement associée à des phénomènes de tolérance, notamment au cours de la tolérance au soi centrale (H. von Boehmer and K. Hafen, 1986) et périphérique (I. Forster and



I. Lieberam, 1996, C. Kurts, et al., 1996). Cette présentation est également liée à l'immunité et a été notamment démontrée dans la présentation d'antigènes provenant de virus (virus influenza, vaccina virus et polio virus), de cellules tumorales (L.J. Sigal and K.L. Rock, 2000), de cellules mortes apoptotiques (M.L. Albert, et al., 1998b) et nécrotiques (Z. Lu, et al., 2000). De plus, il a été montré que cette fonction est exercée *in vivo* par une population particulière de DC chez la souris. Dans cette étude, l'injection de cellules chargées avec l'ovalbumine montre que seules les DC CD8<sup>+</sup> spléniques sont capables de stimuler des CTL spécifiques de cet antigène (J.M. den Haan, et al., 2000). Dans ce modèle, la présentation croisée réalisée par les DC CD8<sup>+</sup> aboutit à l'activation de T cytotoxiques (J.L. Pooley, et al., 2001). Cependant il a été montré que les DC CD8<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup> de la souris sont également capables de "cross-présenter" des antigènes mais après stimulation avec le LPS (J.L. Pooley, et al., 2001). Il est donc possible que différentes populations de DC soient capables de présenter des antigènes exogènes sur leur CMH I dans des conditions différentes.



**Shéma 2:** Les différentes voies de présentation des peptides antigéniques sur les molécules de CMH de classe I et II d'après (W.R. Heath and F.R. Carbone, 2001)

### III.2.4. La présentation sur les molécules CD1.

Les molécules CD1 ont été identifiées comme des molécules non classiques de présentation des antigènes. Elles permettent de présenter des lipides et des glycolipides d'antigènes exogènes ou endogènes (N. Burdin and M. Kronenberg, 1999). Elles contribuent à l'immunité mais sont également impliquées dans l'autoimmunité et les réponses anti-tumorales. L'association antigènes / CD1 se fait dans les endosomes ou les lysosomes et la présentation des antigènes est indépendante de TAP. La molécule CD1 est un marqueur essentiel des DC. Chez l'homme, quatre molécules CD1 (CD1a-d) sont exprimées par les DC myéloïdes tandis que chez la souris, seul le CD1d a été mis en évidence. Les molécules de CD1b-c chez l'homme peuvent présenter des glycolipides à un large répertoire de lymphocytes T. Au contraire, le CD1d chez l'homme et la souris, lie une variété d'antigène plus limitée ( $\alpha$ -galactosylcéramide) et active un répertoire T restreint ainsi que des cellules de type NKT (H. Kitamura, et al., 1999). Le CD1d régule également les lymphocytes intraépithéliaux de l'intestin et les cellules T $\gamma\delta$  (S.A. Porcelli and R.L. Modlin, 1999).

La DC immature capture donc efficacement l'antigène mais ne peut le présenter tandis que la DC mature présente l'antigène mais ne peut plus le capturer. La régulation de la présentation des antigènes joue donc un rôle important dans la régulation fonctionnelle au cours de la maturation des DC. Il a été montré que les motifs ADN de type CpG, stimulus puissant des DC, entraînent une diminution de la présentation des antigènes mais le maintien de la présentation sur des molécules de CMH de classe II recyclées. Ce mécanisme pourrait permettre à la DC de ne plus présenter d'autres antigènes que ceux rencontrés simultanément aux CpG (D. Askew, et al., 2000). Ceci permettrait donc, la coordination entre la présentation de l'antigène (par exemple une bactérie) et le type d'activation lié à cet antigène (les motifs CpG de cette bactérie). Au niveau biochimique, il semble que la régulation de l'apprêtement des antigènes se fasse via le pH des lysosomes (E.S. Trombetta, et al., 2003).

## **IV. Maturation des cellules dendritiques.**

Les DC immatures des tissus périphériques n'ont pas la capacité de stimuler les cellules T de façon efficace. En effet, comme on l'a vu précédemment, elles n'expriment pas, ou de faibles quantités, de molécules de CMH de classe II de surface. De plus, elles n'expriment pas de molécules de costimulation en grande quantité, indispensables à la stimulation des cellules T naïves. Les pathogènes ou des molécules associées aux pathogènes induisent la *maturation* des DC qui s'accompagne de changements phénotypiques et fonctionnels majeurs transformant de façon coordonnée et séquentielle une cellule capturant l'antigène en une cellule présentant l'antigène. La maturation est intimement liée à la migration des DC des tissus vers les organes lymphoïdes. Cependant, l'antigène seul ne suffit pas pour induire une maturation des DC et pour induire une réponse immunitaire *in vivo*, il faut injecter un adjuvant simultanément à un antigène. La fonction de l'adjuvant est en fait d'induire la maturation des DC et la plupart des adjuvants utilisés sont des ligands des TLR. *In vivo*, un antigène ne sera présenté correctement aux cellules T que si celui-ci est associé à un signal de maturation dont la nature est variée. Comme on le verra plus loin, l'absence de signaux de maturation ne permet donc pas aux DC d'induire une réponse immune. Toutefois les DC immatures des tissus sont capables de migrer dans les organes lymphoïdes et initient dans ce cas la tolérance (R.M. Steinman and M.C. Nussenzweig, 2002). La maturation des DC est donc une étape clef dans le contrôle de l'immunité et de la tolérance.

### **IV.1. Les facteurs induisant la maturation des cellules dendritiques et leur récepteurs.**

L'induction de la maturation des DC au cours d'une infection est provoquée par des signaux directs qui correspondent aux molécules associées aux pathogènes (PAMPs). Ces

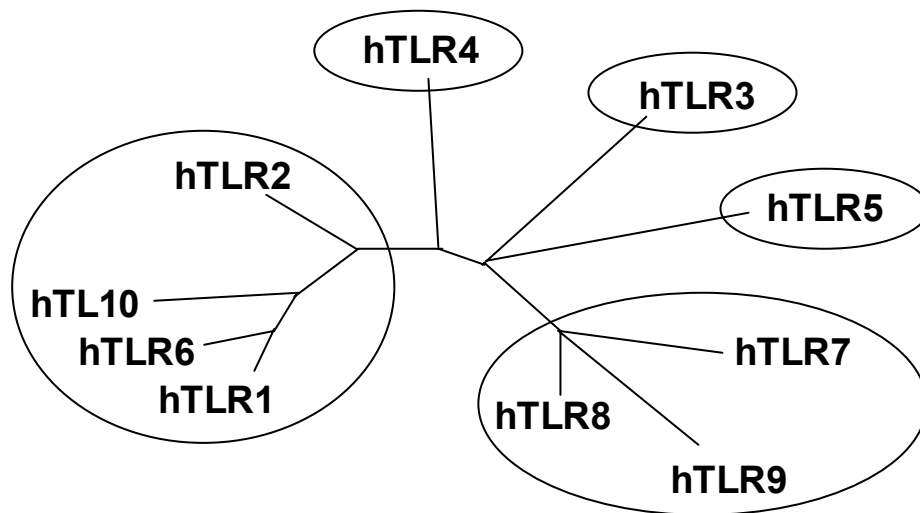
molécules induisent la maturation des DC notamment le LPS (M. Rescigno, et al., 1999), les CpG, l'acide lipotéichoïque (K.S. Michelsen, et al., 2001) et l'ARN double brin (M. Cella, et al., 1999b). Ces molécules sont essentiellement des ligands des TLR et agissent par l'intermédiaire du facteur de transcription NF- $\kappa$ B pour induire une maturation des DC. Ces signaux de maturation permettent également la survie des DC. De plus, il a été montré que l'ARN double brin permet la protection des DC contre l'infection par des virus de manière directe ou via la production d'IFN de type 1 (M. Cella, et al., 1999b). D'autre part la maturation des DC peut être générée par des signaux indirects de l'environnement comme les cytokines proinflammatoires, la destruction tissulaire, ou les HSP.

#### IV.1.1. Les TLR (*Toll Like Receptors*) : les récepteurs des PAMPs

##### a. Description des TLR.

Les TLR sont des récepteurs qui reconnaissent des motifs moléculaires conservés sur différents pathogènes (PAMPs : *Pathogen-Associated Molecular Pattern*) et qui jouent un rôle important au cours de l'immunité innée. Les TLR ont été identifiés par analogie avec les récepteurs Toll étudiés chez la drosophile (R. Medzhitov, et al., 1997). Chez la drosophile, la molécule Toll a un rôle dans la polarisation dorso-ventrale de l'embryon (C. Hashimoto, et al., 1988), mais également dans l'immunité. Il a été montré que des drosophiles mutantes pour la voie de signalisation de la protéine Toll étaient extrêmement sensibles à l'infection par des champignons (B. Lemaitre, et al., 1996). En fait, la voie de la protéine Toll permet la synthèse de la protéine anti-fongique Drosomycin et semble également impliquée dans la résistance aux bactéries (M. Hedengren, et al., 1999, S. Rutschmann, et al., 2002). La protéine Toll possède des domaines intra-cellulaires communs avec le récepteur à l'IL-1 chez les vertébrés (B. Lemaitre, et al., 1996) et un an après la découverte de Toll chez la drosophile un homologue de cette protéine a été identifié chez l'homme et nommé *Toll Like Receptor* (R.

Medzhitov, et al., 1997). Chez les mammifères, il a été maintenant identifié dix TLR différents. Leur localisation chromosomique, leur structure ainsi que leurs types de ligands permettent de définir cinq familles de TLR : la famille du TLR3, du TLR4, du TLR5, du TLR2 et du TLR9 (schéma 3).



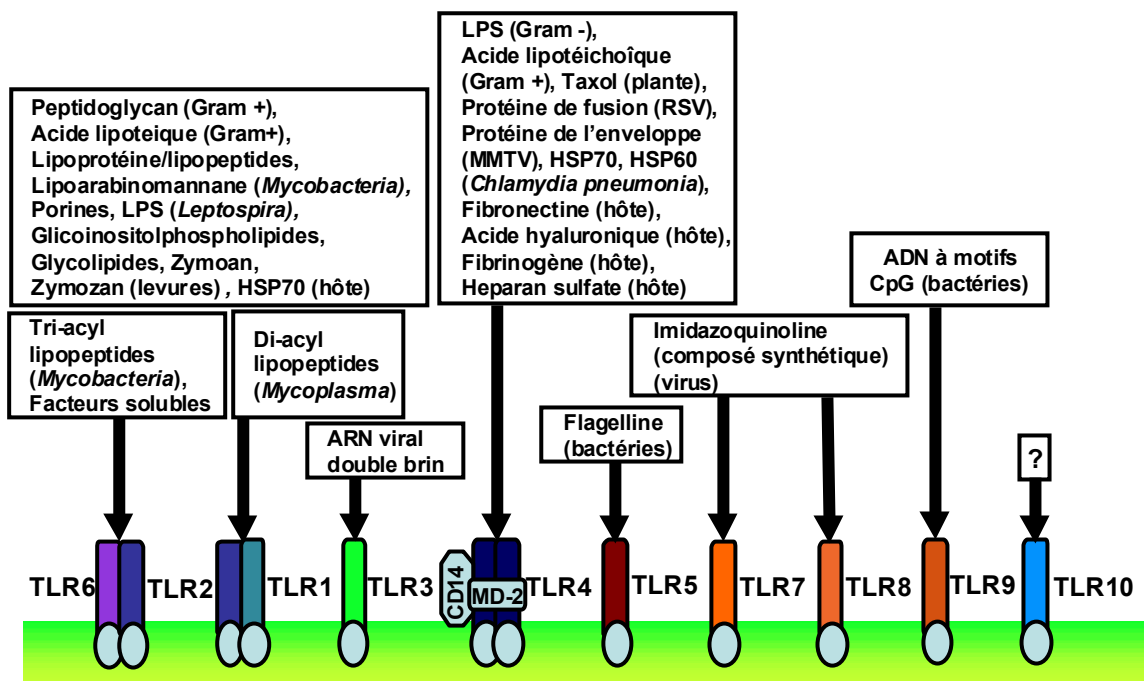
**Schéma 3:** Arbre phylogénique des TLR humains d'après K. Takeda, et al., 2003.

Les ligands connus de chaque TLR sont illustrés dans le schéma 4. Le TLR4 est le plus étudié jusqu'à présent. En effet, l'étude de souris répondant faiblement au LPS a montré que le TLR4 reconnaît le LPS (A. Poltorak, et al., 1998, S.T. Qureshi, et al., 1999). Cependant, cette reconnaissance n'implique pas uniquement le TLR4. Le LPS lié à la LBP (*LPS Binding Protein*) dans le sérum est en fait reconnu par le CD14, exprimé par les monocytes et macrophages, et forme ensuite un complexe CD14/TLR4 (J. da Silva Correia, et al., 2001, Q. Jiang, et al., 2000). De plus, la sensibilité du TLR4 au LPS est augmentée par la protéine MD2 (R. Shimazu, et al., 1999). Plusieurs protéines sont donc impliquées dans la reconnaissance du LPS et le récepteur fonctionnel du LPS pourrait former un large complexe. Le TLR4 reconnaît également des composants viraux (E.A. Kurt-Jones, et al., 2000) et des molécules endogènes. Ces molécules endogènes sont des molécules liées au stress comme les

HSP (K. Ohashi, et al., 2000) et des composants de la matrice extracellulaire (C. Termeer, et al., 2002). Le TLR4 est donc impliqué dans différents aspects de l'inflammation, et ce, même en absence d'infection. La famille du TLR2 qui comprend le TLR1, le TLR6 et le TLR10 reconnaît des composants issus d'une grande variété de micro-organismes (Bactéries Gram<sup>-</sup> et Gram<sup>+</sup>, champignons, mycobactéries). La reconnaissance par le TLR2 nécessite une coopération avec d'autres TLR et en particulier le TLR6 et le TLR1 qui ont une structure très homologue. L'association TLR2/TLR6 ou TLR2/TLR1 confère au TLR2 une reconnaissance spécifique subtile entre différents lipopeptides (O. Takeuchi, et al., 2001, D.H. Wyllie, et al., 2000). Cependant, on ne sait pas si la dimérisation du TLR2 est constitutive ou induite par le pathogène. De plus, il est possible que d'autres TLR soient associés au TLR2. Le TLR10, qui fait partie de la famille du TLR2, est le TLR le plus récemment identifié. Il est exprimé essentiellement sur des cellules immunitaires dans les organes lymphoïdes et ses ligands sont encore inconnus (T. Chuang and R.J. Ulevitch, 2001). De plus, le gène du TLR10 correspond à un pseudogène chez la souris, ce qui rend son étude plus difficile. La famille du TLR9, qui comprend le TLR7 et le TLR8, semble reconnaître différentes structures d'acides nucléiques de micro-organismes. Le TLR9 reconnaît directement des motifs CpG non méthylés d'ADN bactériens très immunogènes (H. Hemmi, et al., 2000). Il semble que les CpG soient liés par le TLR9 dans les endosomes, contrairement au TLR1, 2 et 4 qui reconnaissent leur ligand à la surface cellulaire (H. Wagner, 1999). Les ligands des TLR7 et TLR8 ne sont pas encore connus. Toutefois, des molécules synthétiques imidazoquinolines qui ont un puissant effet antiviral se lient à ces récepteurs (H. Hemmi, et al., 2002, M. Jurk, et al., 2002). Il est donc possible que les TLR7 et TLR8 reconnaissent des produits ou composants viraux, ou des molécules produites par l'hôte après une infection virale. Les TLR3 et TLR5 forment des familles ne comprenant qu'un seul TLR. Le TLR5 reconnaît la flagelline qui est un des constituants principaux du flagelle des bactéries à Gram<sup>-</sup> et qui contribue à leur virulence (F.

Hayashi, et al., 2001), tandis que le TLR3 reconnaît l'ARN double brin produit par les virus au cours de leur cycle de réplication (L. Alexopoulou, et al., 2001).

Les TLR possèdent une homologie avec le domaine intracellulaire du récepteur à l'IL-1 et partagent donc une voie de signalisation identique. Les voies de signalisation des TLR passe par des protéines adaptatrices dont MyD88, puis par IRAK, et TRAF6 pour aboutir à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B qui permet la synthèse de cytokines et l'induction de molécules de costimulation (S. Akira, et al., 2001). Il a également été mis en évidence une voie de signalisation indépendante du MyD88 dans les TLR. Cette voie est encore mal connue mais elle aboutirait pour le TLR4, par l'intermédiaire de NF- $\kappa$ B, à l'activation de la famille de gènes induits par l'IFN $\gamma$  comme l'IP10, à l'activation de caspases comme la caspase-1 et à l'induction de molécules de costimulation (S. Akira, et al., 2001). Il faut noter que le LPS, dans les macrophages, induit la sécrétion de l'IL-18 dans sa forme active, clivée par la caspase-1, de manière indépendante de MyD88 (E. Seki, et al., 2001).



**Schéma 4:** Ligands connus des TLR . K. Takeda, et al., 2003.

## b. Expression des TLR sur les cellules dendritiques.

Les TLR sont exprimés dans de nombreux tissus et en particulier dans l'épithélium des organes en contact avec des pathogènes (poumon, intestin, rein, peau) et dans les tissus immunitaires (K.A. Zarembek and P.J. Godowski, 2002). Les cellules du système immunitaire qui expriment les TLR sont essentiellement des cellules phagocytaires comme les monocytes, les macrophages, les mastocytes et les DC (K.A. Zarembek and P.J. Godowski, 2002). Comme on le verra plus loin, l'expression des TLR sur les DC joue un rôle important puisqu'elle est liée à leur maturation et à l'induction d'une réponse adaptative. Chez l'homme, l'expression des TLR dans les différentes populations de précurseurs de DC dans le sang a été étudiée. Les monocytes expriment une grande variété de TLR : TLR1, 2, 4, 5, 6, 8 tandis que les DC plasmacytoïdes, qui ne sont pas des cellules phagocytaires, expriment essentiellement les TLR7 et 9, les TLR1, 6 et 10 étant exprimés en faible quantité par ces cellules (N. Kadowaki, et al., 2001b). L'expression restreinte de TLR par les pDC reflète leur spécificité de fonction. L'expression des TLR dans les sous-populations de DC du sang chez l'homme est donc mutuellement exclusive. Il a été cependant montré que les monocytes pouvaient exprimer le TLR7 (T. Ito, et al., 2002). D'autre part, les DC immatures dérivées des monocytes expriment les TLR1, 2, 4, et 5 (A. Visintin, et al., 2001). Chez la souris, l'expression des TLR dans les différentes populations de DC a été peu étudiée. Cependant, il a été récemment montré que les sous-populations de DC spléniques CD8<sup>+</sup> et CD8<sup>-</sup> et les pDC spléniques expriment des TLR différents. Il a été montré également que ces trois populations expriment de faibles quantités de TLR4 en comparaison avec les DC dérivées des cellules de la moelle osseuse (BMDC) (A. Boonstra, et al., 2003). Les DC CD8-CD4<sup>+</sup> spléniques n'expriment pas le TLR3 et exprime de forte quantité de TLR8 et 9. Les DC CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> n'expriment pas les TLR 5 et 7 tandis que les DC CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> expriment tous les TLR. Les pDC expriment un panel plus important de TLR par rapport aux pDC de l'homme. Elles



expriment les TLR1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9. (A.D. Edwards, et al., 2003). L'analyse des TLR dans les populations de DC murines n'a pas été réalisée de manière quantitative et il est donc difficile de comparer l'expression de TLR entre eux et entre les sous-populations. Comme chez l'homme, les pDC de la souris sont sensibles aux ligands du TLR7 et TLR9. De plus, il semble que l'expression des différents TLR sur les DC CD11c<sup>+</sup> de la rate varie entre différentes souches de souris (T. Liu, et al., 2002).

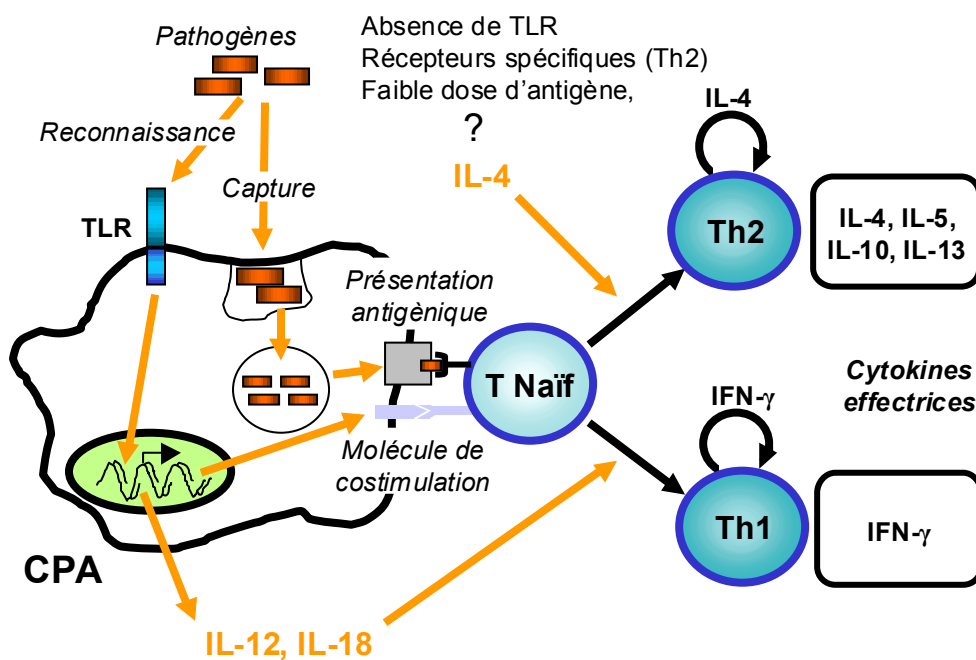
L'état de maturation des DC influence également l'expression des TLR. Il a été montré qu'au cours de la différenciation du monocyte, l'expression de l'ensemble des TLR diminue et les DC matures dérivées des monocytes n'expriment plus que le TLR1 et le TLR6. Le TLR3 et la MD2 sont cependant augmentés au cours de la différenciation des monocytes en DC immatures (M. Muzio and A. Mantovani, 2001, A. Visintin, et al., 2001). L'expression des TLR dans les cellules présentatrices de l'antigène est également régulée par les ligands des TLR et par certaines cytokines. Par exemple, le LPS diminue l'expression du TLR4 dans les macrophages (F. Nomura, et al., 2000) mais augmente l'expression de TLR2 (T. Matsuguchi, et al., 2000). Cependant, la modulation de l'expression des TLR dans les DC après stimulation par les différents PAMPs ou par des cytokines n'a pas été étudiée précisément.

### c. TLR et modulation de la réponse immune.

Les TLR jouent un rôle essentiel dans l'initiation de la réponse innée. La ligation des TLR par les pathogènes induit, sur les phagocytes, notamment les DC, une activation qui se traduit par la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires, et par l'augmentation de la capacité des cellules à phagocyter et à tuer leurs cibles. Ce sont les précurseurs des DC immatures (les monocytes et pDC) qui ont des rôles effecteurs directs dans la réponse immunitaire innée. Les pDC, par l'intermédiaire de leur TLR, produisent de

grandes quantités d'IFN $\alpha$  et  $\beta$  après stimulation avec un virus et participent directement à la réponse innée anti virale, tandis que les monocytes produisent des cytokines telles que le TNF $\alpha$ , l'IL-6, et l'IL-12 et participent à l'inflammation. La signalisation via les TLR entraîne également sur les DC l'augmentation des molécules de costimulation et donc l'augmentation de leur capacité à stimuler les cellules T (S. Akira, et al., 2001). Les TLR entraînent donc l'activation de la réponse innée mais aussi de l'immunité adaptative (schéma 5). L'expression de différents TLR par les différentes sous-populations de DC suggère qu'ils puissent avoir une influence sur la réponse T induite par les DC. L'initiation de la réponse adaptative pourrait donc être contrôlée par la réponse innée via les TLR. De nombreux ligands des TLR entraînent, par l'intermédiaire des DC, une différenciation T de type Th1, généralement induite par la production d'IL-12 (S. Akira, et al., 2001). De plus, il a été montré dans des souris déficientes en MyD88 que la réponse Th1, contrairement à la réponse Th2, était supprimée après immunisation en présence d'adjuvant complet de Freund (M. Schnare, et al., 2001). Les TLR2 et TLR4, en particulier, sont des puissants inducteurs de l'IL-12 sur les DC (B. Pulendran, et al., 2001b, S. Thoma-Uszynski, et al., 2000). De la même manière, le TLR9 induit la production d'IFN $\alpha$  et d'IL-12 par les pDC chez l'homme et chez la souris et il a été montré que le TLR7 induisait la production d'IFN $\alpha$  par les pDC et d'IL-12 par les monocytes (T. Ito, et al., 2002). Ces cellules peuvent dans d'autres conditions (stimulation par l'IL-3) induire une réponse Th2. Il existe peu d'exemple d'une induction d'une réponse de type Th2 via les TLR. Cependant, des DC déficientes en MyD88 peuvent induire une réponse de type Th2 après stimulation par le LPS, suggérant que l'induction d'une réponse Th2 par les TLR se fait de manière MyD88 indépendante (T. Kaisho and S. Akira, 2002). De plus, il a été montré récemment que le LPS à faible dose pouvait induire une réponse de type Th2 via le TLR4 dans un modèle de sensibilisation allergique murin (S.C. Eisenbarth, et al., 2002). De même, il a été montré que certains types de LPS induisaient une réponse Th2 *in vivo* (B. Pulendran,

et al., 2001b). Des populations de DC différentes, possédant un panel de TLR qui leur est propre, peuvent entraîner des réponses T différentes. L'expression des TLR ou l'origine lymphoïde des DC pourraient donc être responsable de l'orientation de la réponse immunitaire. Il semble que ce soit le pathogène et l'origine des DC qui dictent le type de réponse induit par les DC. En effet, des pathogènes différents peuvent induire une différenciation T différente dans la même population de DC, montrant ainsi la plasticité fonctionnelle de ces cellules (A.D. Edwards, et al., 2002) (A. Boonstra, et al., 2003). Cependant, certaines populations de DC, comme les pDC, possèdent un panel de TLR restreint et ne peuvent donc pas répondre à tous les pathogènes malgré leur plasticité. Il semble donc que l'ontogénie des DC participe également à l'orientation de la réponse immunitaire par ces cellules.



**Schéma 5:** Régulation du développement des lymphocytes T CD4 par les TLR sur la CPA, modifié d'après S. Akira, et al., 2001.

Pasare et al. ont montré que les DC, via les TLR et leur production d'IL-6, jouent un rôle dans l'inhibition de la fonction des lymphocytes T régulateurs en induisant des lymphocytes effecteurs réfractaires à l'action inhibitrice des lymphocytes T régulateurs (C. Pasare and R.

Medzhitov, 2003). Cependant, une autre étude a montré l'implication directe de TLR4 sur l'augmentation de la fonction régulatrice des T CD4 CD25 (I. Caramalho, et al., 2003). Cependant, ces derniers résultats sont contestables en particulier du fait des doses de LPS utilisées. Le rôle direct ou indirect des TLR sur la fonction régulatrice des cellules T reste donc à définir plus clairement.

#### IV.1.2. Les facteurs indirects de maturation des cellules dendritiques.

Les cellules nécrotiques mais non apoptotiques ont été montrées comme induisant la maturation des DC (B. Sauter, et al., 2000). Cet effet serait dû aux molécules de stress : les HSP en particulier l'HSP60, les HSP70 et la Gp96 qui induisent la maturation des DC en se liant au TLR2 et TLR4 et qui sont produites notamment par les cellules nécrotiques (S. Basu, et al., 2000). Une étude controversée a toutefois montré que les cellules apoptotiques pouvaient induire la maturation des DC (P. Rovere, et al., 1998).

Les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$ , l'IL-1, l'IL-6, le GM-CSF, la prostaglandine E2 et l'IFN $\alpha$  produites par les cellules de l'immunité innée (macrophages, mastocytes) et par d'autres cellules dendritiques augmentent la maturation des DC (A.K. Wesa and A. Galy, 2001) et ont parfois un effet synergique (C. Rieser, et al., 1997). Les effets de ces cytokines peuvent être régulés par les cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 (C. Buelens, et al., 1997) et le TGF $\beta$ . Il a été montré que le TGF $\beta$  pouvait inhiber la maturation des cellules de Langerhans stimulées par du LPS, du TNF $\alpha$  et de l'IL-1, ce qui permet de réguler la maturation de ces cellules perpétuellement soumises à des cytokines pro-inflammatoires de la peau (F. Geissmann, et al., 1999). La prostaglandine E2 peut également avoir un effet inhibiteur sur les DC et inhibe la production d'IL-12 par les DC dans les organes lymphoïdes (C.M. Hilkens, et al., 1996). Il est peu probable que ces signaux de maturation sur les DC soient redondants et il est possible qu'ils agissent sur des populations

de DC différentes. De plus, les différents signaux peuvent avoir des effets synergiques ou se réguler entre eux.

#### IV.1.3. Les signaux dépendants des lymphocytes T.

L'étape finale de maturation des DC est constituée par les signaux délivrés par les lymphocytes T et a lieu dans les organes lymphoïdes. Ces signaux sont représentés essentiellement par le CD40L qui est exprimé rapidement par les cellules T CD4, activées par les DC (C. Caux, et al., 1994, M. Cella, et al., 1996). L'interaction CD40-CD40L a lieu dans les organes lymphoïdes. Les DC stimulées par le CD40L, exprimé par les cellules T CD4 activées, sont alors capables de stimuler directement les T CD8 (D.H. Schuurhuis, et al., 2000) et sont appelées «*licensed*» DC (J.P. Ridge, et al., 1998). Il existe également des voies de maturation des DC indépendantes du CD40L qui font intervenir les molécules FasL et OX40 sur les lymphocytes T et les molécules Fas et OX40L sur les DC (Y. Ohshima, et al., 1997, M. Rescigno, et al., 2000).

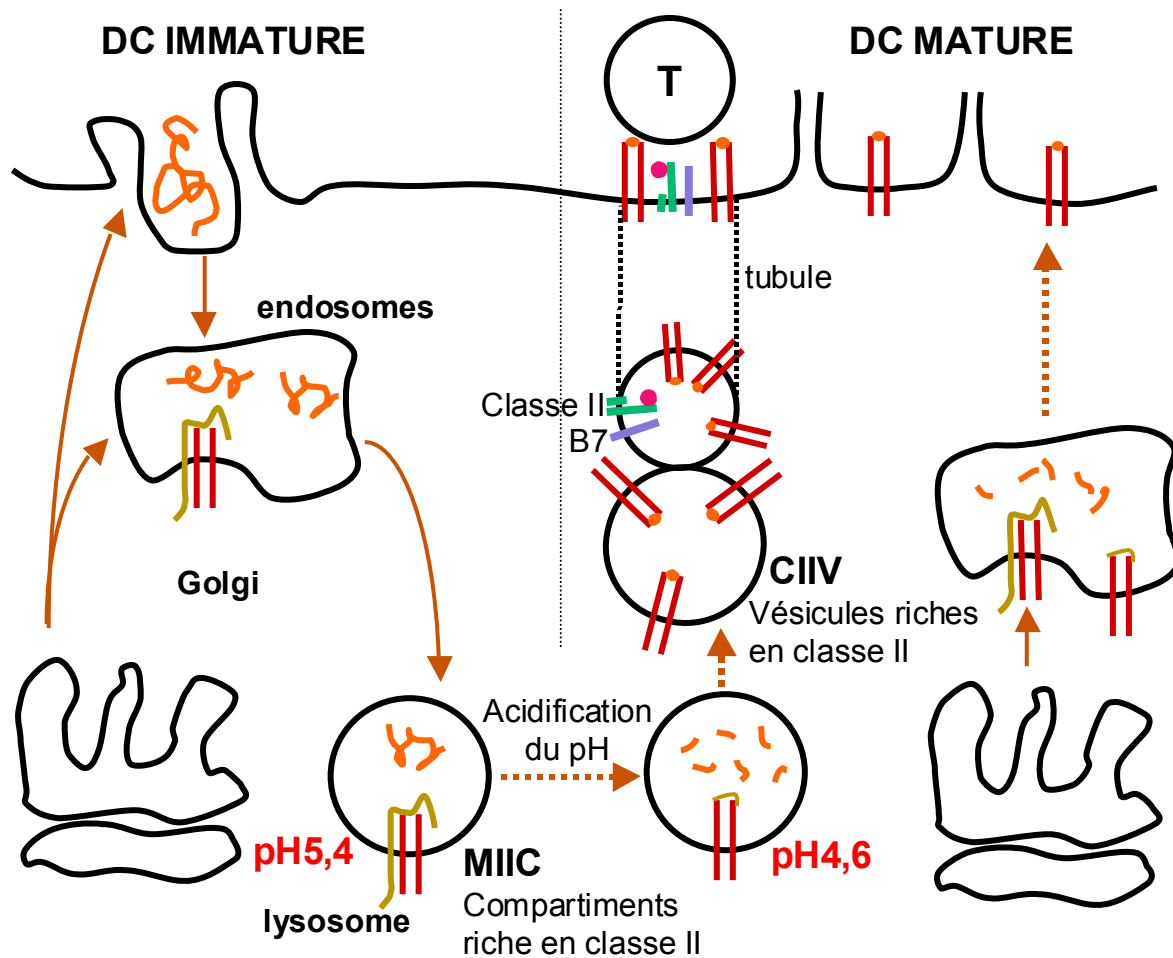
#### **IV.2. Changements phénotypiques et fonctionnels associés à la maturation.**

Les changements phénotypiques et fonctionnels qui accompagnent le processus de maturation sont nombreux et ont pour but de permettre à la DC d'aller présenter l'antigène aux lymphocytes T dans les ganglions drainant. Très peu d'études ont décrit les voies de signalisation aboutissant à la maturation des DC. Il a néanmoins été montré que le LPS induit la maturation de DC via l'activation de NF- $\kappa$ B et induit l'augmentation de la survie des DC via l'activation de ERK (M. Rescigno, et al., 1998).

Après la rencontre de signaux de danger, les DC semblent adhérer transitoirement dans les tissus. Elles produisent de grandes quantités de chimiokines comme MIP-1 $\alpha$  (*macrophage inflammatory protein 1*), MIP-2, et MCP-1 (*monocyte chemotactic protein 1*) et des cytokines

pro-inflammatoires comme le  $\text{TNF}\alpha$ , l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-18 et contribuent ainsi à l'amplification de la réponse inflammatoire et de la réponse innée.

La maturation des DC se caractérise ensuite par une diminution considérable de leur capacité à capturer l'antigène (F. Sallusto, et al., 1995) et par l'augmentation de la présentation des complexes CMH / peptide qui est en fait le résultat d'un enchaînement d'événements contrôlés (schéma 6). La maturation des DC entraîne une augmentation transitoire de la synthèse des molécules du CMH de classe II qui s'accompagne d'une activation des protéases et aboutit à la présentation d'un grand nombre de complexe CMH / peptide, à la membrane (M. Cella, et al., 1997). De plus, la diminution du recyclage du CMH de classe II ainsi que la diminution de l'endocytose participe à la stabilisation des complexes CMH / peptide membranaires. L'exportation des molécules de classe II depuis les compartiments qui les concentrent (MIIC) vers la membrane se fait dans des compartiments spécialisés appelés CIIVs (class II rich vesicles). Ces endosomes tardifs forment des tubules jusqu'à la membrane au niveau du contact avec un lymphocyte T spécifique et entraînent donc une polarisation de l'expression des complexes au niveau de la synapse immunologique (M. Boes, et al., 2002). De plus, les CIIV contiennent également des molécules de CMH de classe I et de B7.2 et concentrent donc à la surface cellulaire les ligands du TCR et les molécules de costimulation (S.J. Turley, et al., 2000).



**Shéma 6:** Régulation des molécules de CMH de classe II durant la maturation des DC d'après I. Mellman and R.M. Steinman, 2001.

Plus tard au cours de la maturation, la synthèse de nouvelles molécules de classe II cesse en raison de la répression du facteur CIITA (class II transactivator) (S. Landmann, et al., 2001). Au contraire, on observe une augmentation de la synthèse des molécules du CMH de classe I. Récemment, il a été montré que la régulation l'apprêtement des antigènes se faisait via le pH des lysosomes. En effet, Trombetta et al. ont montré que dans les DC immatures le pH lysosomal était sous optimal (5,4) pour la plupart des enzymes alors qu'il diminue dans les DC matures (4.6), ce qui permet la protéolyse des antigènes et leur chargement sur les molécules de CMH. L'acidification du pH des lysosomes dans les DC en cours de maturation est provoquée par l'activation de pompe à proton (E.S. Trombetta, et al., 2003).

Les DC matures expriment en grandes quantités les molécules de costimulation CD80, CD86, CD40 et RANK (*receptor activator NF- $\kappa$ B*) (J. Banchereau and R.M. Steinman, 1998, K. Inaba, et al., 1994) et des molécules d'adhérence CD54 (ICAM-1) et CD58 (LFA-3) (C. Caux, et al., 1994). La molécule CD83 apparaît sur les DC matures humaines (J. Banchereau and R.M. Steinman, 1998). Afin de permettre la migration des DC dans les organes lymphoïdes, on observe une modification de l'expression des récepteurs aux chimiokines comme la disparition de l'expression de la molécule CCR6 et l'apparition du récepteur CCR7 (A. Iwasaki and B.L. Kelsall, 2000). Des modifications morphologiques importantes permettent également l'engagement des DC vers un phénotype de DC migrantes. Elles se traduisent par une diminution de l'adhérence, par exemple les cellules de Langerhans perdent leur expression de la cadherin E, qui permet leur adhésion avec les kératinocytes (A. Tang, et al., 1993), par une augmentation de la mobilité et par une réorganisation du cytosquelette avec apparition de longues dendrites très mobiles (J. Banchereau and R.M. Steinman, 1998). La maturation induit la sécrétion de nombreuses cytokines par les DC et notamment l'IL-12. Il faut noter que les DC, qui sont dans un stade de maturation avancée, perdent leur capacité à répondre à un deuxième stimulus de maturation. Elles sont alors appelées des DC *exhausted* ou paralysées (A. Langenkamp, et al., 2000). A ce stade de maturation les DC perdent leur aptitude à produire de l'IL-12 et induisent préférentiellement des réponses Th2 (A. Langenkamp, et al., 2000, A. Tang, et al., 1993).

## **V. Les migrations des cellules dendritiques.**

Pour assumer son rôle de sentinelle dans les tissus, la migration est essentielle pour les DC. En effet, bien que les antigènes se trouvent le plus souvent dans les tissus non lymphoïdes et aient des localisations potentiellement différentes, les sites d'initiation des



réponses immunitaires T et B se situent dans les organes lymphoïdes où les cellules T naïves recirculent en permanence. Les migrations des DC, comme de l'ensemble des leucocytes, dépendent de l'expression relative de molécules chimioattractantes, les chimiokines, et de leurs récepteurs spécifiques. Ces chimiokines et leur récepteurs sur les DC sont donc régulés afin de permettre la migration des DC sur les sites d'inflammation puis dans les organes lymphoïdes secondaires. La migration des DC est donc intimement liée à la maturation et l'injection de LPS par exemple induit la migration des DC des tissus vers les organes lymphoïdes (C. Reis e Sousa and R.N. Germain, 1999), (G.G. MacPherson, et al., 1995).

Les chimiokines sont considérées comme les molécules chimiotactiques effectrices permettant le recrutement des leucocytes dans les tissus (T.A. Springer, 1994). Elles forment une super famille de protéines qui sont séparées en 4 groupes déterminés par la position des cystéines dans la région N terminale de la chimiokine. La plupart des chimiokines sont regroupées dans deux sous-familles : les chimiokines  $\alpha$  (ou CXC) qui sont essentiellement impliquées dans la migration des neutrophiles et des lymphocytes et les chimiokines  $\beta$  (ou CC), qui jouent un rôle dans la migration de nombreuses cellules mononucléées, dont les DC. La lymphotactin ( $\gamma$  ou C chimiokine), ainsi que la fractalkine ( $\delta$  ou CX3C chimiokine), définissent les deux autres groupes de chimiokines (M. Baggiolini, et al., 1997). Les récepteurs des chimiokines sont exprimés par les leucocytes et peuvent lier plusieurs chimiokines différentes. Les couples chimiokines-récepteurs peuvent être classés en deux catégories, les récepteurs-chimiokines constitutifs et les récepteurs-chimiokines inductibles. Les récepteurs constitutifs permettent le trafic et le développement des leucocytes au repos et jouent un rôle important dans l'établissement d'un système immunitaire fonctionnel (A.E. Proudfoot, 2002). Les récepteurs inductibles sont exprimés par les cellules au cours d'une inflammation. Par exemple, les monocytes activés avec du LPS expriment MIP1 $\alpha$  et MIP1. $\beta$

(S.D. Wolpe, et al., 1988). Toutefois, il existe des exceptions et le CCR6 est exprimé constitutivement par les lymphocytes T et les DC mais est diminué au cours de la maturation des DC (A.E. Proudfoot, 2002).

Les DC immatures expriment les récepteurs aux chimiokines CCR1, CCR6, CCR2, CCR5, et CXCR1 qui leur permettent de migrer dans les tissus inflammés en réponse à différentes chimiokines pro-inflammatoires comme MIP-3 $\alpha$  (*macrophage inflammatory protein*) (CCL20) ligand de CCR1 et CCR6 ainsi que RANTES, IL-8 et MIP-1 $\alpha$ . L'importance des récepteurs CCR1 et CCR5 dans la migration des DC dans les tissus au repos ou inflammés a été montrée par une étude des DC de l'épithélium de la trachée chez le rat (P.A. Stumbles, et al., 2001). Les signaux de maturation entraînent une diminution de l'expression de ces récepteurs et deviennent ainsi insensibles au MIP-3 $\alpha$  et aux autres chimiokines pro-inflammatoires. Cette perte de sensibilité pourrait faire intervenir plusieurs mécanismes. Il a notamment été montré que la production de MIP-3 $\alpha$  endogène par les DC immatures pouvait inhiber l'expression de CCR6, de manière autocrine (M.C. Dieu, et al., 1998). Cette diminution de CCR6 s'accompagne d'une augmentation de l'expression du récepteur CCR7 qui va permettre la migration des DC jusqu'aux ganglions lymphatiques via MIP-3 $\beta$  et la SLC (*secondary lymphoid-tissue chemokine*). La SLC est exprimée par les cellules épithéliales des vaisseaux lymphatiques et permet la migration des DC dans le sinus sous-capsulaire des ganglions drainant à travers les vaisseaux (M.D. Gunn, et al., 1998), tandis que le MIP-3 $\beta$  (CCL19) permet aux DC de rejoindre les zones T des ganglions. Une fois dans les ganglions, la DC mature devient une source de MIP-3 $\beta$  et SLC, ce qui permet une amplification et une persistance du signal chimio-attractant (F. Sallusto, et al., 1998). De plus, le signal de maturation donné par les lymphocytes T dans les organes lymphoïdes induit la sécrétion par les DC de chimiokines attirant les lymphocytes T (l'IL-8, la fractalkine) (H.L.

Tang and J.G. Cyster, 1999) ce qui favorise la rencontre entre les DC porteuses d'antigènes et leurs lymphocytes T spécifiques.

Les sous-populations de DC ne semblent pas exprimer des récepteurs aux chimiokines identiques, ce qui leur confère des profils de migration différents. Il a été montré que les DC issues des cellules souches CD34<sup>+</sup> *in vitro* exprime le CCR6 contrairement aux DC CD11c<sup>+</sup> immatures ou aux DC dérivées des monocytes (M.C. Dieu, et al., 1998). Plus récemment, il a été montré que les monocytes et les DC plasmacytoïdes du sang chez l'homme possédaient des profils de migration très différents. Ces deux sous-populations de DC possèdent une expression relativement similaire des différents récepteurs aux chimiokines pro-inflammatoires. Cependant, ces récepteurs ne sont pas fonctionnels chez les DC plasmacytoïdes et ne leur permettent pas de migrer dans les tissus inflammés contrairement aux monocytes. Les DC plasmacytoïdes répondent exclusivement à la chimiokine CXCL12 qui est produite dans les ganglions lymphatiques, ce qui explique qu'elles se localisent préférentiellement dans les organes lymphoïdes secondaires. De plus, les deux sous-populations de DC expriment CCR7 après stimulation *in vitro* (G. Penna, et al., 2002). La migration des DC n'est pas seulement observée en présence d'un signal de maturation. En effet, les DC migrent en permanence des tissus vers les ganglions lymphatiques. Il a été montré chez le rat qu'une population particulière de DC CD4<sup>-</sup> contenant des corps apoptotiques de cellules épithéliales intestinales migrait constitutivement vers les ganglions drainant (F.P. Huang, et al., 2000). La signification de cette migration constitutive n'est pas encore claire. Cependant il semble, comme on le verra plus loin, que des DC immatures qui migrent vers les organes lymphoïdes permettent le maintien de la tolérance au soi. L'état de maturation des DC semble donc capital dans l'induction de la tolérance ou de l'immunité.

## **VI. Fonction des cellules dendritiques matures : la stimulation des lymphocytes T.**

Comme on l'a vu précédemment la maturation des DC entraîne leur relocalisation dans les organes lymphoïdes où les DC peuvent interagir avec les cellules T qui recirculent en permanence dans les zones T. Contrairement aux lymphocytes B et aux macrophages, les DC matures sont les seules CPA capables d'activer les lymphocytes T naïfs *in vitro* et *in vivo* (J. Banchereau and R.M. Steinman, 1998). C'est la seule fonction connue des DC matures qui leur vaut le nom de cellules présentatrices de l'antigène professionnelles. Leur efficacité à présenter l'antigène et à stimuler les cellules T a été montrée dans de nombreuses expériences *in vitro* et *in vivo*. L'injection de DC chargées avec un antigène induit une réponse primaire importante des lymphocytes T CD4 et T CD8 (K. Inaba, et al., 1990). De plus, l'interaction directe entre DC et cellules T dans les organes lymphoïdes a été montrée par immunofluorescence sur des coupes de ganglions, ce qui confirme la présentation des antigènes de manière directe aux lymphocytes T (E. Ingulli, et al., 1997).

### **VI.1. Les molécules de costimulation nécessaires à l'interaction cellules dendritiques / cellules T.**

Les DC matures expriment 10 à 100 fois plus de molécules du CMH, et donc de complexes CMH / peptide, que les autres CPA (lymphocytes B, macrophages) (K. Inaba, et al., 1997). L'interaction entre le TCR et le complexe CMH-peptide constitue le signal 1 d'activation des lymphocytes T. Néanmoins, l'affinité entre le CMH et le TCR est faible et de nombreuses molécules d'adhésion permettent de stabiliser cette interaction pendant un temps suffisant pour que la cellule T réponde à ce premier signal. La durée d'interaction nécessaire de stimulation des lymphocytes T naïfs a été estimée à 6-12 heures (G. Iezzi, et al., 1998). Ces

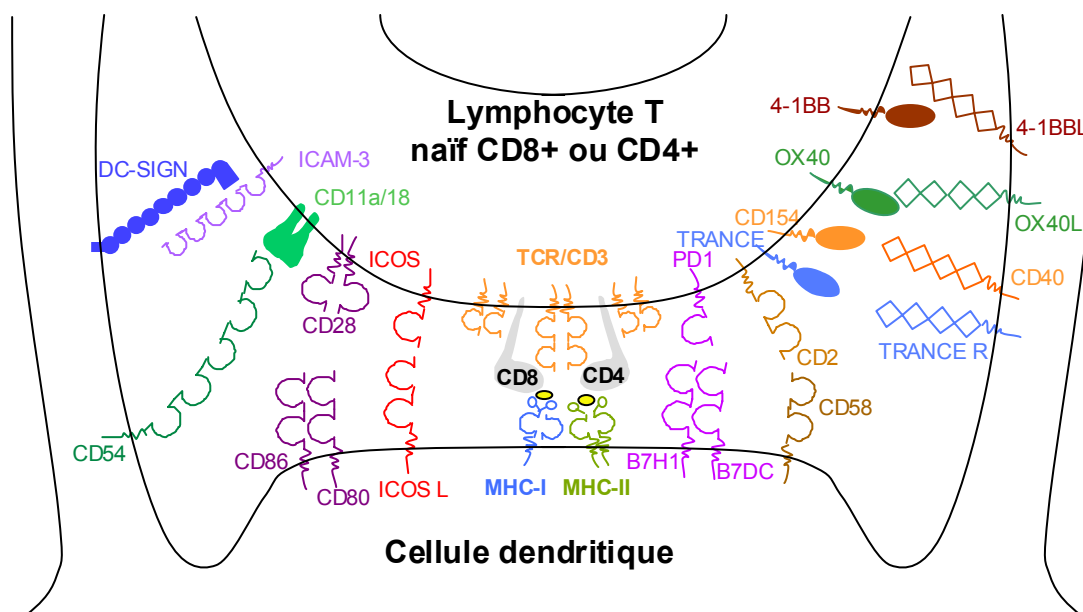
molécules d'adhésion appartiennent à la famille des intégrines (LFA-1, CD11b) ou à la superfamille des Ig (CD2, CD54/ICAM-1, CD58/LFA-3) (D. Bell, et al., 1999, D.N. Hart, 1997). Les DC expriment également spécifiquement un récepteur de haute affinité pour ICAM-3 qui, lui, est exprimé sur les cellules T naïves. Ce récepteur appelé DC-SIGN (CD209 ; *dendritic cell specific ICAM-3 grabbing non integrin*) n'est exprimé que par les DC et son interaction avec ICAM-3 stabiliserait l'étape initiale de contact entre la DC et la cellule T naïve (T.B. Geijtenbeek, et al., 2000).

L'activation d'une cellule T nécessite un premier signal correspondant à la reconnaissance du complexe CMH : peptide spécifique, mais également un second signal dit signal de costimulation qui, le plus souvent, ne peut être fourni que par une CPA (schéma 7). Les DC matures expriment de grandes quantités de CD80 et CD86 qui interagissent avec la molécule CD28 sur le lymphocyte T. Cette liaison entraîne une augmentation de la prolifération des lymphocytes, une augmentation de leur survie et induit la production d'IL-2, de TNF $\alpha$ , d'IFN $\gamma$  et de la lymphotoxine par les cellules T (L.H. Boise, et al., 1995, P.J. Lucas, et al., 1995, C.B. Thompson, et al., 1989). Les molécules CD80 et CD86 peuvent également se lier à la molécule CTLA-4 qui est exprimée sur les cellules T activées (P.S. Linsley, et al., 1992). Cependant, leur affinité pour CTLA-4 est plus forte que pour CD28 et la liaison de CTLA-4 délivre un signal inhibiteur aux cellules T, qui permet une modulation de leur réponse (T.L. Walunas, et al., 1994). D'autres molécules de costimulation ont été identifiées et se regroupent en deux super familles : la famille des molécules du B7 (ICOS, B7-H1, B7-DC) et la famille des molécules du TNF (41BBL, OX40L, CD40L, TRANCE) (schéma 7). La molécule ICOS-L se lie à la molécule ICOS (*inducible costimulator*) sur les cellules T activées et joue un rôle important dans le développement des cellules T effectrices. Les molécules 4-1BBL et OX40L, qui se lient aux molécules 4-1BB et OX40 sur les cellules T activées, entraînent une augmentation de l'activation des cellules T CD8 et T CD4

respectivement (P. Lane, 2000, W.W. Shuford, et al., 1997). Récemment, il a été décrit que la molécule PD-1 se liait à la molécule B7-H1, un membre de la famille des molécules B7, exprimée sur les DC humaines et murines (G.J. Freeman, et al., 2000). Cependant, l'effet stimulateur ou inhibiteur de l'activation des cellules T, par l'interaction B7-H1 / PD-1 est controversé. Il a également été montré qu'une nouvelle molécule de costimulation spécifique aux DC, B7-DC, pouvait lier PD-1 et costimulait la prolifération des cellules T ainsi que la production d'IL-2 et d'IFN $\gamma$  par ces cellules (S.Y. Tseng, et al., 2001). Toutes ces molécules sont regroupées dans l'espace, à la surface des DC, formant une zone de contact étroit avec les cellules T, appelée synapse immunologique.

Un véritable dialogue s'établit, et en cas d'activation de la cellule T, les DC reçoivent en retour des signaux d'activation qui passent pour la plupart par des molécules de la superfamille du TNF comme CD40L (CD154) ou TRANCE (*TNF-related activation-induced cytokine*) exprimées sur la cellule T et par leurs récepteurs CD40 et RANK sur la DC, appartenant à la superfamille du récepteur au TNF. L'activation des DC par la voie CD40-CD40L entraîne l'augmentation de l'expression des molécules CD80 et CD86 et la production de cytokines comme IL-1, TNF, IL-12 et de chimiokines par la DC (C. Caux, et al., 1994). Le CD40L induit également l'expression de OX40L sur les DC (E. Stuber, et al., 1995). De plus, la liaison du CD40 est suffisante pour induire une maturation des DC qui leur confère la capacité de stimuler les lymphocytes T CD8 (D.H. Schuurhuis, et al., 2000). L'engagement de RANK par son ligand TRANCE, exprimé sur les cellules T activées, entraîne une augmentation de la survie des DC et induit la production par les DC d'IL-1, d'IL-6 et d'IL-12, ce qui augmente la réponse proliférative des cellules T (R. Josien, et al., 1999, B.R. Wong, et al., 1997). L'IL-12, produite par les DC après interaction avec les molécules de la famille du TNF (CD40 et TRANCE), amplifie en retour la réponse des cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques ainsi que la production d'IFN $\gamma$  par les cellules NK et la différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> en

cellules Th1 qui produisent de grandes quantités d'IFN $\gamma$  (G. Trinchieri, 1995). En fonction des stimuli, les DC activées sont enfin capables de produire un grand nombre de cytokines comme l'IL-1, l'IL-4, l'IL-12, l'IL-6, l'IL-10, l'IL-15, l'IL-16, l'IL-17 le TNF $\alpha$ , l'IFN $\alpha/\beta$  et l'IFN $\gamma$  (R. Josien, et al., 1999) et influence alors la réponse immune. Récemment, il a été montré que l'IL-2 était produite de manière précoce par les DC activées. Cette cytokine pourrait représenter le mécanisme moléculaire expliquant la capacité des DC à stimuler les cellules T (F. Granucci, et al., 2002).



**Shéma 7:** Les molécules de co-stimulation impliquées dans la stimulation des lymphocytes T par les cellules dendritiques.

## VI.2. La différenciation des lymphocytes T.

Suite à la reconnaissance antigénique et selon les facteurs environnementaux, les lymphocytes T se différencient en sous-types de lymphocytes qui expriment des cytokines différentes et qui sont impliqués dans des réponses immunes différentes (schéma 8).

### VI. 2.1. Les lymphocytes T CD4.

Les cellules T CD4 peuvent se différencier en deux voies Th1 ou Th2 (*T helper* ou T auxiliaires). Cette différenciation a lieu au cours de la rencontre avec l'antigène présenté sur les molécules de CMH de classe II et passe d'abord par un stade intermédiaire appelé Th0. Les lymphocytes Th1 sont induits par les cytokines IL-12, IFN $\gamma$  et IL-23 produites par les DC et les macrophages (A. O'Garra, et al., 1995, B. Oppmann, et al., 2000). Ils ont un rôle pro-inflammatoire et produisent des cytokines telles que l'IFN $\gamma$ , l'IL-2 et le TNF $\alpha$  (T.R. Mosmann, et al., 1986). Ils induisent la stimulation des macrophages, des lymphocytes T cytotoxiques et des cellules NK. Ils peuvent également activer des lymphocytes B qui produiront des anticorps d'isotype IgG2, qui permettent l'élimination des pathogènes intracellulaires par ADCC (*antibody dependent cellular cytotoxicity*) (L.M. Bradley, et al., 1996). Les lymphocytes Th1 sont donc impliqués dans une réponse à médiation cellulaire et permettent l'élimination des pathogènes intracellulaires, de certaines bactéries et des virus. Les lymphocytes Th2 sont induits par l'IL-4 produit par les DC, les mastocytes, les basophiles, les lymphocytes T $\gamma\delta$ , et les lymphocytes T CD4 Th2 (G. Le Gros, et al., 1990, S.L. Swain, et al., 1990). Ils produisent des cytokines telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-10, l'IL-13 (T.R. Mosmann, et al., 1986). Toutefois, l'origine de l'IL-4 reste encore mal connue in vivo et la différenciation Th2 est un phénomène moins clair que la différenciation Th1. Ils induisent l'activation des lymphocytes B, qui produiront des anticorps d'isotypes, IgM, IgG fortement opsonisant (IgG1 et IgG3 chez la souris et IgG2 et IgG4 chez l'homme) et IgE permettant la dégranulation des mastocytes (T.L. Stevens, et al., 1988). Le lymphocyte Th2 est donc impliqué dans une réponse à médiation humorale et permet l'élimination de pathogènes extra-cellulaires et de parasites multicellulaires. Ces deux sous-populations de cellules T se régulent entre elles. L'IFN $\gamma$  produit par les cellules Th1 inhibe la prolifération et la sécrétion des cytokines des cellules Th2 tandis que l'IL-4 et l'IL-10 inhibent la



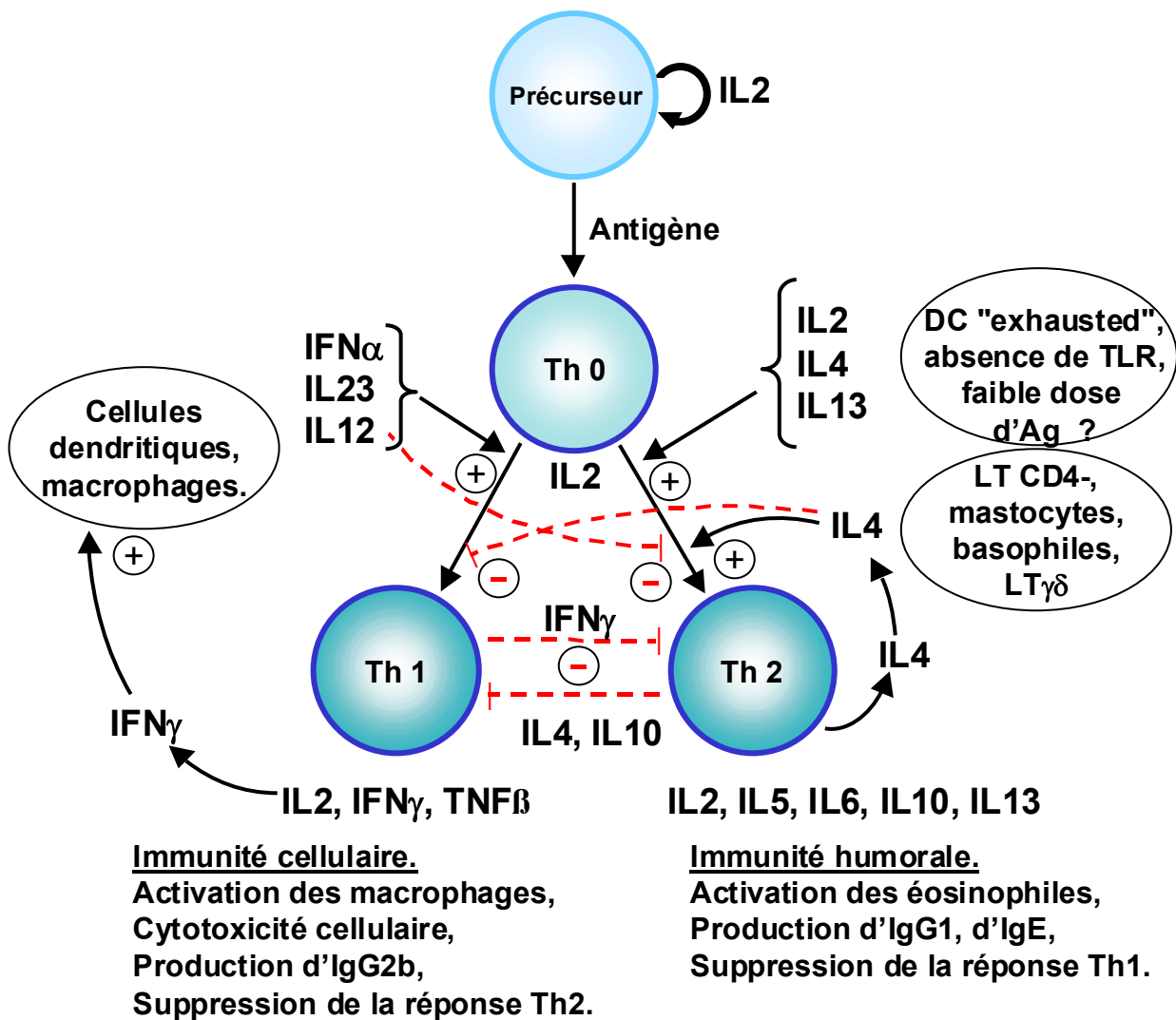
prolifération et la production de cytokines des cellules Th1 (T.R. Mosmann, et al., 1990, S.L. Swain, et al., 1990). L'IL-12 produit par les DC est également un inhibiteur des réponses Th2.

#### VI.2.2. Les lymphocytes T CD8.

Les lymphocytes T CD8 reconnaissent l'antigène présenté par les molécules du CMH de classe I, la majorité des cellules sont donc des cibles potentielles pour les cellules T CD8 (S. Jiang, et al., 1998, A. Noble, et al., 1998). De nombreux travaux ont révélé l'existence de sous-populations au sein des lymphocytes T CD8 qui peuvent être compartimentés selon des caractéristiques similaires aux lymphocytes T CD4 . Ces sous populations ont été appelées Tc1 et Tc2 (A. Noble, et al., 1995). Les lymphocytes Tc1 sont induits par l'IL-12 et l'IFN $\gamma$  et produisent de l'IL-2 et de l'IFN $\gamma$ . Les lymphocytes Tc2 sont induits par l'IL-4 et produisent de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-10. Ces deux types de cellules T possèdent mécanismes de cytotoxicité différents : les lymphocytes Tc1 utilisant le système granzymes/perforines et le FasL, tandis que les lymphocytes Tc2 utilisent essentiellement le mécanisme de cytotoxicité perforine/granzyme. Les cellules T cytotoxiques participent essentiellement à la réponse contre des virus ou les bactéries intracellulaires et limitent la croissance des tumeurs. Cependant ils peuvent être impliqués dans des réponses différentes. Il a été montré que les lymphocytes Tc2, en présence de fortes doses d'IL-4, perdaient leur capacité cytotoxique et entraînaient la production d'anticorps IgE (G. Le Gros and F. Erard, 1994). Ces mêmes lymphocytes ont également été mis en évidence chez des patients atteints de la lèpre lèpromateuse et inhibent les lymphocytes T CD4 spécifiques de la lèpre (P. Salgame, et al., 1991).

La stimulation des lymphocytes T CD4 et T CD8 naïfs par les DC est donc un événement critique puisque la différenciation de ces cellules détermine la nature de la réponse

adaptative. Les DC jouent donc un rôle de traducteur du micro-environnement en induisant la différenciation de populations différentes de lymphocytes T.



**Shéma 8:** Régulation de la différenciation des lymphocytes T CD4 en sous-populations de type Th1 et Th2.

## VII. Hétérogénéité et plasticité des cellules dendritiques.

Bien que les DC présentent des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles communes, l'expression de certains marqueurs a mis en évidence une certaine hétérogénéité des DC. Il est maintenant très clair, comme on l'a vu dans le paragraphe II, que malgré une ontogénie controversée, les DC ont un phénotype différent d'un organe à un autre. Les

cellules de Langerhans expriment par exemple le CD1a, ce qui n'est pas le cas des DC dermales ou de celles qui circulent dans le sang. Plus récemment il a été mis en évidence des populations différentes de DC à l'intérieur d'un même organe qui pourraient exercer des fonctions spécifiques. L'origine de ces populations de DC est actuellement très étudiée. En effet, elles peuvent représenter des stades différents de maturation d'une même lignée de DC mais pourraient également être le produit du développement de lignées particulières. La réalité est certainement un compromis entre les deux modèles et donne aux DC une très large plasticité fonctionnelle.

### **VII.1. Les sous-populations de cellules dendritiques chez l'homme.**

Chez l'homme, très peu d'études ont pu être réalisées sur les DC des organes lymphoïdes. Le sang est le «tissu» le plus disponible et est une source de DC immatures et de précurseurs de DC. Dans le sang humain, les DC ont un phénotype très hétérogène qui est plus dû à des stades différents de maturation qu'à différentes sous-populations de DC (D.N. Hart, 1997). Chez l'homme, on n'observe pas d'expression du marqueur CD8, ce qui ne permet pas une comparaison directe des différentes populations de DC avec celles de la souris.

#### VII.1.1. Les cellules dendritiques *in vivo*.

##### a. Les cellules dendritiques des tissus.

##### • **Les cellules de Langerhans.**

Les cellules de Langerhans sont les premières DC à avoir été mises en évidence. Elles représentent les DC de la peau et possèdent un phénotype et des fonctions particuliers qui sont résumés dans le tableau 3. Les cellules de Langerhans expriment des marqueurs myéloïdes

comme le CD11c, le CD11b, le CD13 et le CD33. Elles expriment également des marqueurs spécifiques comme la langerine (CD207), une lectine de type C et possèdent des organelles particuliers, les granules de Birbeck (R. Ren, et al., 1993). Ces marqueurs spécifiques semblent liés à la présentation des complexes CMH/peptides. Lorsqu'on incube ces DC à 37°C la langerine est internalisée et se localise avec les granules de Birbeck cependant elle ne se colocalise pas avec des molécules de CMH de classe II. La langerine est donc certainement impliquée dans le trafic des antigènes extracellulaires sur le CMH de classe I (J. Valladeau, et al., 1999). Les DC de Langerhans capturent les antigènes de la peau et migrent dans les ganglions pour présenter ces antigènes aux lymphocytes T. La migration des cellules de Langerhans a été très étudiée et a permis d'identifier les mécanismes de migration des DC en générale. Les cellules de Langerhans sont capables de maturer et produisent en général, des cytokines comme l'IL-12, l'IL1 $\beta$ , l'IL-6 et l'IL-18 qui jouent un rôle important dans l'initiation d'une réponse immune cutanée (K. Lore, et al., 1998, G. Schuler and R.M. Steinman, 1985). Les cellules de Langerhans ont été impliquées dans l'initiation de l'hypersensibilité de contact (J.W. Streilein, et al., 1984) et récemment il a été montré que l'expression importante du Fc $\epsilon$ RI permettait une amplification des réponses allergiques via les cellules de Langerhans (D. Maurer, et al., 1995)

#### • Les DC interstitielles.

Les DC interstitielles sont présentes dans les interstitium de tous les organes non lymphoïdes. Ces DC expriment de nombreux marqueurs myéloïdes mais pas la langerine ou les granules de Birbeck. Ces DC ont été peu étudiées chez l'homme in vivo mais peuvent être générées in vitro à partir de monocytes et en présence de GM-CSF et d'IL-4 ou à partir de cellules CD34<sup>+</sup> et en présence de GM-CSF et TNF $\alpha$  (C. Caux, et al., 1997). Ces DC

pourraient correspondre in vivo aux DC dérivées des monocytes. Il a également été suggéré que les DC interstitielles qui ont un phénotype proche des DC des centres germinatifs migrent dans les follicules lymphoïdes (B. Pulendran, et al., 2001a).

Lignées	Lymphoïdes		Myéloïdes	
	CD Plasmacytoïde	CD Interstitielle	CD de Langerhans	CD dérivée des monocytes
<b>Précurseurs sanguins</b>	PreDC2 (ou IPC)			Monocyte (PreDC1)
<b>Phénotype</b>	CD11c <sup>-</sup> CD1a <sup>-</sup> IL3R <sup>+</sup>	CD11c <sup>+</sup> CD1a <sup>+</sup> IL3R <sup>-</sup>	CD11c <sup>+</sup> CD1a <sup>+</sup> IL3R <sup>-</sup>	CD11c <sup>+</sup> CD1a <sup>+</sup> IL3R <sup>-</sup>
<b>Production d'IFN<math>\alpha/\beta</math></b>	++++	-	-	-
<b>CD matures</b>				
<b>Phénotype</b>	CD11c <sup>-</sup> IL3R $\alpha$ <sup>+</sup> CMH classe II <sup>+</sup> CD11b <sup>-</sup> CD13 <sup>-</sup> CD33 <sup>-</sup> CD4 <sup>++</sup> CD1a <sup>-</sup> Granule de Birbeck <sup>-</sup> Langerine <sup>-</sup> CD86 <sup>+</sup> CD40 <sup>+</sup> DC-LAMP <sup>+</sup> BDCA2 <sup>+</sup> BDCA4 <sup>-</sup>	CD11c <sup>+</sup> IL3R $\alpha$ <sup>-</sup> CMH classe II <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD13 <sup>+</sup> CD33 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD1a <sup>-</sup> Granule de Birbeck <sup>-</sup> Langerine <sup>-</sup> CD86 <sup>+</sup> CD40 <sup>+</sup> DC-LAMP <sup>+</sup> ? ?	CD11c <sup>+</sup> IL3R $\alpha$ <sup>-</sup> CMH classe II <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD13 <sup>+</sup> CD33 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD1a <sup>+</sup> Granule de Birbeck <sup>+</sup> Langerine <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup> CD40 <sup>+</sup> DC-LAMP <sup>+</sup> ? ?	CD11c <sup>+</sup> IL3R $\alpha$ <sup>-</sup> CMH classe II <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD13 <sup>+</sup> CD33 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD1a <sup>-</sup> Granule de Birbeck <sup>-</sup> Langerine <sup>-</sup> CD86 <sup>+</sup> CD40 <sup>+</sup> DC-LAMP <sup>+</sup> BDCA2 <sup>-</sup> BDCA4 <sup>+</sup>
<b>Localisation</b>	Zones T des organes lymphoïdes-précurseurs dans le sang	Zones T des organes lymphoïdes et centre germinatif-Précurseurs dans le sang-CD immatures dans les tissus	Zones T des organes lymphoïdes et centre germinatif-Précurseurs dans le sang-CD immatures dans les épithélia	Zones T des organes lymphoïdes-Précurseurs dans le sang
<b>Expression des TLR</b>	TLR 7-9	?	?	TLR 1-2-4-5-8
<b>Fonctions</b>				
Sécrétion d'IL12	+/-	++++	++++	++++
Sécrétion d'IL10	-	++++	+/-	?
Sécrétion d'IFN $\alpha/\beta$	++++	-	-	-
Priming des T CD4 <sup>+</sup>	++	++++	++++	++++
Priming des T CD8 <sup>+</sup>	++	+++	++++	++++
Interaction DC-B	?	++++	+	?
Différenciation Th1	++/-	?	?	++++
Différenciation Th2	++	?	?	+/-

**Tableau 3 :** Caractéristiques des sous-populations de DC humaines, modifié d'après (B. Pulendran, et al., 2001a)

## b. Les cellules dendritiques des organes lymphoïdes.

Très peu d'études ont été réalisées sur les DC isolées des organes lymphoïdes sans étapes de culture chez l'homme. Il a été montré que les DC isolées de la rate et des amygdales sont hétérogènes pour l'expression des marqueurs CD4, CD11b et CD11c ce qui suggèrent une complexité des populations similaires avec les DC des organes lymphoïdes chez les rongeurs comme on le verra plus loin (D. McIlroy, et al., 1995).

Les DC thymiques ont été plus étudiées. On distingue dans le thymus deux populations de DC qui possèdent un phénotype et des fonctions différents (S. Vandenabeele, et al., 2001). La population majeure est CD11b<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD45RO<sup>faible</sup> et exprime peu de marqueurs myéloïdes. Elle possède une morphologie dendritique typique et exprime de fortes quantités de CMH de classe II et de molécules de costimulation ainsi que le marqueur CD83. La deuxième population minoritaire est CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> et peut être divisée en deux populations, une immature qui exprime le CD14, et une mature qui est négative pour le CD14 mais exprime le CD83. Ces deux populations sont capables d'induire une forte prolifération de cellules T CD4 en culture mais seule la population CD11b<sup>-</sup> est capable de produire de grandes quantités d'IL-12 après stimulation. La comparaison de ces populations de DC avec d'autres populations chez l'homme ou chez la souris est assez difficile. Toutefois, la population minoritaire CD11b<sup>+</sup> du fait de son expression de marqueurs myéloïdes semble proche des DC caractérisées dans les amygdales (C.G. Mueller, et al., 1997). De plus les pDC thymiques matures ont un phénotype proche des DC thymiques CD11b<sup>-</sup>, cependant ces cellules produisent de l'IL-12, cytokine dont la production par les pDC humaines est controversée (M. Cella, et al., 1999a, N. Kadowaki, et al., 2000). Cette population est également proche des DC CD8<sup>+</sup> thymiques identifiées chez la souris (D. Vremec, et al., 2000)].

Une population de DC présente dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes a également été identifiée. Ces DC appelées GCDC (*Germinal center dendritic cell*) ont un phénotype de DC myéloïdes et joueraient un rôle dans l'activation des lymphocytes B (G. Grouard, et al., 1996). Ces résultats sont cependant à considérer avec précaution puisqu'ils n'ont pas été reproduits.

### c. Les cellules dendritiques et leurs précurseurs sanguins.

Les populations du sang les plus connues sont les précurseurs immédiats de DC comme les monocytes ou les DC plasmacytoïdes (pDC) et les cellules dendritiques immatures CD11c<sup>+</sup>.

#### • Les DC immatures CD11c<sup>+</sup>.

Les DC immatures CD11c<sup>+</sup> ont été identifiées en parallèle avec une population de DC CD11c<sup>-</sup> (U. O'Doherty, et al., 1994) qui correspond en fait au précurseur des pDC comme on le verra par la suite (G. Grouard, et al., 1997). Les DC CD11c<sup>+</sup> sanguines se caractérisent par une expression des molécules de CMH de classe II, du CD45RO et par l'absence de marqueur d'autres populations de leucocytes comme le CD3, CD14, le CD16 et le CD19. Ces DC sont capables d'induire une prolifération des cellules T en culture (U. O'Doherty, et al., 1994). Plus récemment l'expression des TLR a été étudiée dans cette population de DC. Elle exprime en forte quantité le TLR 1, 2, 3, n'exprime pas le TLR9 et exprime faiblement les autres TLR (N. Kadowaki, et al., 2001b). Ce panel de TLR est très proche de celui des monocytes. Ces cellules sont donc sensibles à différents stimuli et produisent de l'IL-12 ainsi que des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et le TNF $\alpha$ . Cette population de DC immatures ressemble aux monocytes et semble correspondre à des DC d'origine myéloïde. Elles

pourraient représenter des DC migrant des tissus vers les ganglions via le sang (U. O'Doherty, et al., 1994).

- **Le monocyte.**

Le monocyte est un précurseur de DC très plastique puisqu'il peut engendrer également des macrophages dans certaines conditions, comme on l'a vu dans le paragraphe II. Le monocyte est souvent étudié en parallèle avec les pDC car, contrairement à ces dernières, il constitue le prototype du précurseur de DC myéloïdes.

Les monocytes expriment des marqueurs myéloïdes et de faibles quantités de molécules de CMH de classe II et de costimulation (tableau 3) (B. Pulendran, et al., 2001a). Les monocytes se caractérisent par une forte capacité de capture antigénique et expriment des récepteurs d'endocytose comme le MMR. Ils expriment également les TLR 1, 2, 4, 5 et 8 qui leur permettent de répondre à de nombreux pathogènes. Chez l'homme le panel de récepteurs exprimés par les monocytes est complémentaire de celui exprimé par les pDC. Le TLR7 a toutefois été décrit sur le monocyte dans certaines études (T. Ito, et al., 2002). Les monocytes sont les précurseurs les plus utilisés pour générer des DC *in vitro*. En présence de GM-CSF et d'IL-4 ou après un stimulus de phagocytose, les monocytes se différencient en DC immatures, dites DC1, qui peuvent être maturées avec du TNF $\alpha$  (N. Romani, et al., 1996, F. Sallusto and A. Lanzavecchia, 1994). La présence de M-CSF provoque cependant la différenciation de ces cellules en macrophages (C. Caux, et al., 1996). Ces résultats suggèrent qu'il existe plusieurs sous-populations de monocytes qui seraient à l'origine des DC ou des macrophages. Pour expliquer la différenciation du monocyte *in vivo*, un modèle de traversée de l'endothélium a été mis au point *in vitro* et se compose d'une matrice de collagène, mimant les tissus, recouverte d'une couche de cellules endothéliales (G.J. Randolph, et al., 1998). Il apparaît que les monocytes migrent à travers les cellules endothéliales et se logent dans la matrice de



collagène, ce qui représenterait l'entrée des monocytes sanguins dans les tissus. Certains monocytes vont ensuite migrer à nouveau à travers l'endothélium et se différencier alors en DC. Cette migration inverse symboliserait le transit des monocytes des tissus vers la lymphe. Parallèlement, les monocytes qui restent dans la matrice de collagène se différencient en macrophages. Comme on le verra plus loin, l'hypothèse d'une différenciation du monocyte dirigée par la traversée de l'endothélium semble être confirmée *in vivo* chez la souris.

Les DC1 (DC dérivées des monocytes) sont des cellules qui stimulent fortement la prolifération des lymphocytes T CD4 et T CD8. Il a été montré que les DC dérivées des monocytes produisent des cytokines pro-inflammatoires et de l'IL-12 après stimulation. Cette production d'IL-12 est associée à la stimulation de cellules Th1 (M.C. Rissoan, et al., 1999). Toutefois les DC dérivées des monocytes ont également été montrées comme induisant une réponse de type Th2 lorsqu'elles sont stimulées avec de l'IL-1 $\beta$ , de la prostaglandine E2 et du TNF $\alpha$  (P. Kalinski, et al., 1999) ou lorsqu'elles sont cultivées à faible ratio avec les cellules T (H. Tanaka, et al., 2000). Il a été montré récemment que les pDC et les monocytes interagissent leurs fonctions durant une infection virale. L'IFN de type I produit par les pDC peut inhiber la différenciation des monocytes et diminuer la production d'IL-12 et d'IFN $\gamma$  produit par ces cellules. En revanche, l'IL-10 produit par les monocytes infectés par un adeno-virus inhibe la production d'IFN de type I par les pDC (W. Zou, et al., 2001). Les monocytes sont donc des cellules très plastiques dont les fonctions principales sont la capture de l'antigène. La maturation de ces précurseurs *in vitro* induit des DC capables de produire de fortes quantités d'IL-12 et d'initier un priming des T CD4 Th1. De plus, la différenciation des monocytes en DC semble être réelle *in vivo*.

- **Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC).**

Identification des pDC.

Les pDC ont été identifiés chez l'homme dans le sang et dans les organes lymphoïdes. Il faut d'abord noter que la nomenclature désignant ces DC n'est pas claire. En effet, la différence n'est pas toujours faite entre les précurseurs des pDC nommés pré-DC2 et les pDC immatures, d'autant que ces deux types de cellules possèdent des fonctions relativement similaires et sont localisées dans le sang et les organes lymphoïdes (B. Blom, et al., 2002). La maturation de ces cellules in vitro aboutit à la différenciation de pDC matures qui ont été nommées DC2 (M.C. Risoan, et al., 1999).

L'identification des pDC s'est faite en plusieurs étapes. En effet, les pDC ont longtemps été appelées lymphocytes T plasmacytoïdes du fait de leur morphologie et de leur faible expression de marqueurs myéloïdes et de leur expression de marqueur des lymphocytes T comme le CD4. Il a tout d'abord été montré que ces lymphocytes plasmacytoïdes étaient des précurseurs de DC et ces cellules ont alors pris le nom de DC plasmacytoïdes (pDC) (G. Grouard, et al., 1997, J. Olweus, et al., 1997). Siegal et al. et Cella et al. ont ensuite montré que les pDC et les IPC (*Interferon producing cell*), cellules connues depuis longtemps pour produire de grandes quantités d'IFN de type I en réponse à stimulation virale sont les mêmes cellules (M. Cella, et al., 1999a, F.P. Siegal, et al., 1999). Ces cellules ont été identifiées dans de nombreux tissus notamment dans le sang, la moelle osseuse, les amygdales, la rate et le thymus. Ces DC ont une morphologie plasmacytoïde qui se caractérise par un noyau excentré et un réticulum endoplasmique très développé.

### Phénotype et origine des pDC.

Les pDC ont un phénotype particulier (tableau 3). Elles expriment de faibles quantités de molécules de costimulation et de CMH de classe II. Elles n'expriment pas de molécules myéloïdes comme le CD13, le CD11b/c ou le CD33 mais se caractérisent chez l'homme par une expression importante du récepteur à l'IL-3, de la molécule BDCA2 et du CD4. Contrairement à ce qui est observé chez la souris, ces cellules n'expriment pas la molécule CD8. Elles ont une durée de vie en culture très faible mais fortement augmentée par l'IL-3 (G. Grouard, et al., 1997). Les pDC sont des précurseurs de DC qui se différencient *in vitro*, après stimulation, en DC matures dites DC2 qui migreraient dans les ganglions lymphatiques via la L-selectine (M. Cella, et al., 1999a). Les DC2 n'expriment pas de marqueurs myéloïdes, comme son précurseur et possèdent toutes les caractéristiques de DC (G. Grouard, et al., 1997, M.C. Rissoan, et al., 1999). Cependant, on ne sait pas à quelle population de DC correspondent les DC2 *in vivo* et il est possible que la formation des DC2 nécessite une infection microbienne.

L'origine des pDC, comme on l'a vu dans le paragraphe II semble lymphoïde malgré l'absence de preuve directe de leur ontogénie. Les pDC se développent sous l'influence du FLT3-L qui augmente considérablement le nombre de ces cellules quand il est injecté *in vivo* (B. Pulendran, et al., 2000) Ce facteur de croissance peut donc être utilisé pour générer des pDC à partir des cellules CD34<sup>+</sup> de la moelle osseuse (K. Weijer, et al., 2002). Les pDC thymiques diffèrent phénotypiquement des pDC périphériques et il semble que ces cellules puissent se développer séparément des autres DC dans le thymus (B. Blom, et al., 2002). Leur rôle dans le thymus reste encore inconnu.

### Production de cytokines par les pDC.

Les pDC représentent une population de DC particulières de part leurs fonctions dans la réponse innée. En effet, ces cellules produisent des quantités énormes d'IFN de type I (IFN $\alpha$ ,  $\beta$ ) en réponse à des virus comme le HSV (Herpes Simplex Virus) ou le virus influenza (M. Cella, et al., 1999a, N. Kadowaki, et al., 2000, F.P. Siegal, et al., 1999). Les IFN de type I inhibent directement la réplication virale dans les cellules infectées (A. Isaacs and J. Lindenmann, 1987), ils augmentent l'activité des cellules NK et des macrophages (J.R. Ortaldo, et al., 1983) et augmentent la prolifération des T CD8 mémoires en induisant l'IL-15 (X. Zhang, et al., 1998). Les pDC via les IFN jouent donc un rôle essentiel dans la réponse innée anti-virale. De plus, les pDC sont capables de produire de l'IFN $\alpha$  en réponse à des bactéries (SAC, E. coli, MT). Parmi les composés bactériens, les motifs CpG d'ADN bactérien constituent l'adjuvant induisant la production d'IFN $\alpha$  par les pDC (N. Kadowaki, et al., 2001a) et il existe plusieurs types de CpG qui induisent la production de quantités différentes d'IFN $\alpha$  (A. Krug, et al., 2001).

Les pDC sont également capables de produire de l'IL-12 après stimulation avec les CpG (A. Krug, et al., 2001). Cette production d'IL-12 est cependant controversée chez l'homme (M. Cella, et al., 1999a, N. Kadowaki, et al., 2000), alors qu'elle est clairement définie chez la souris.

Les pDC reconnaissent les pathogènes via les TLR. Il est maintenant bien défini que différentes populations de DC expriment des TLR différents, ce qui renforce la notion de lignées de DC différentes. Les pDC contrairement aux monocytes, expriment le TLR9 qui leur confère une sensibilité aux CpG et le TLR7 dont le ligand n'est pas encore connu mais qui pourrait reconnaître des particules virales. Il a également été détecté une faible expression des TLR1, 6 et 10 sur les pDC (D. Jarrossay, et al., 2001, N. Kadowaki, et al., 2001b, A. Krug, et al., 2001). Les CpG via le TLR9 induisent une production d'IFN $\alpha$  par les pDC (A.

Krug, et al., 2001) et il a été montré que les imidazoquinolines (ligands synthétique du TLR7) induisent également la production d'IFN $\alpha$  par ces cellules (A. Dzionek, et al., 2001, H. Hemmi, et al., 2002). Le panel de TLR exprimé par les pDC est assez restreint et ne leur permet pas de répondre à tous les micro-organismes. Cependant, il est complémentaire avec celui exprimé par les monocytes et permet à l'ensemble des DC de reconnaître un grand nombre de pathogènes. L'identification du ligand naturel du TLR7 permettrait de déterminer quelles molécules virales ou bactériennes sont reconnues par les pDC et induisent la production d'IFN $\alpha$ .

Les mécanismes de capture de l'antigène par les pDC sont largement inconnus et ces cellules possèdent une faible capacité de phagocytose. Le BDCA2, un marqueur spécifique des DC, a été récemment identifié et pourrait jouer un rôle dans la capture des antigènes par ces cellules. Cependant la ligation de BDCA-2 induit une diminution de la production de l'IFN $\alpha$  par les pDC. Le BDCA-2 constitue donc un moyen pour les pathogènes d'échapper à la réponse immunitaire (N. Kadowaki, et al., 2000).

#### Stimulation et différenciation des lymphocytes T par les pDC.

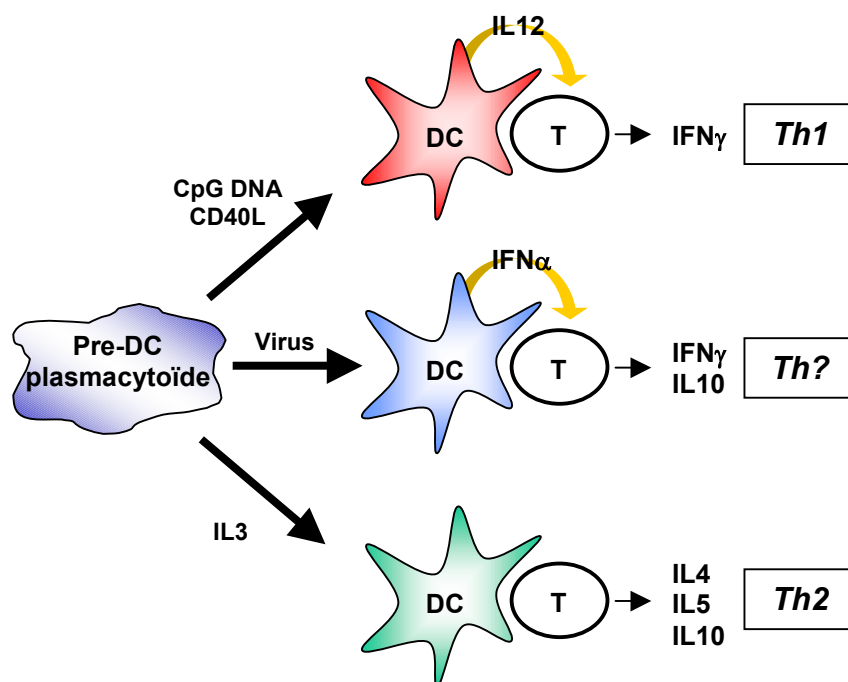
La stimulation virale n'induit pas uniquement la production d'IFN $\alpha$  par ces cellules mais aussi leur différenciation en DC (F.P. Siegal, et al., 1999). Cette différenciation a lieu en trois jours et ne semble pas nécessiter de facteurs exogènes, l'IFN $\alpha$  agissant de manière autocrine pour induire la survie des pDC (N. Kadowaki and Y.J. Liu, 2002). Les CpG et les imidazoquinolines sont également des facteurs de maturation des pDC via l'IFN $\alpha$  (T. Ito, et al., 2002, A. Krug, et al., 2001). Ces études suggèrent que les pDC constituent un lien critique entre l'immunité innée et l'immunité adaptative par leur capacité à produire de l'IFN $\alpha$  et à potentiellement initier une réponse des lymphocytes T.

Comme pour les autres types de DC, l'induction de différents lymphocytes T helper par les pDC a longtemps été contradictoire du fait des différentes conditions utilisées. Les pDC ont d'abord été associées au développement de lymphocytes Th2. En effet, les pDC stimulées avec du CD40L et de l'IL-3 entraînent la différenciation de cellules T produisant de l'IL-4 et de l'IL-5 (M.C. Rissoan, et al., 1999). Parallèlement, il a été montré que les DC issues des monocytes sont capables de générer une réponse de type Th1 et ces résultats ont largement conforté l'idée que chaque population de DC induit la différenciation de cellules Th différents. Cependant, d'autres études ont montré, par la suite, la variabilité du type de réponse T induite par les pDC en fonction du stimulus de départ. Il est maintenant admis que les pDC peuvent induire trois types de réponses T différentes adaptées au type de pathogène rencontré par la DC (schéma 9).

Les CpG induisent la production d'IL-12 par les pDC qui initient une réponse Th1 (A. Krug, et al., 2001). Cette production d'IL-12 n'est observée qu'en présence de CpG et de CD40L et augmente au fur et à mesure que la pDC mature, tandis que la production d'IFN $\alpha$  diminue parallèlement. L'IFN $\alpha$  peut augmenter l'expression du récepteur à l'IL-12 sur les lymphocytes T (C.A. Biron, 2001). Il existe donc une coopération entre l'IL-12 et l'IFN $\alpha$  pour induire une réponse Th1. Les pDC produisent deux cytokines Th1 majeures et la production d'IL-12 est donc étroitement régulée du fait de son danger potentiel. Sa production en grande quantité est dépendante du CD40L et est restreinte aux CpG qui sont rapidement dégradés dans l'organisme, ce qui limite les risques d'autoimmunité (S. Rothenfusser, et al., 2002). Toutefois les pDC semblent jouer un rôle important dans l'induction du Lupus érythémateux, maladie auto-immune dans laquelle l'hyperactivation des pDC est en cause (P. Blanco, et al., 2001).

D'autre part, une stimulation virale des pDC entraîne la stimulation de lymphocytes T, différents des cellules T classiques Th1 ou Th2, produisant de l'IFN $\gamma$  et de l'IL-10 (N.

Kadowaki, et al., 2000). L'IFN $\gamma$  produit par ces cellules T semble dépendant de l'IFN $\alpha$  mais pas de l'IL-12 produit par les pDC, tandis que la production d'IL-10 est indépendante de ces cytokines. L'existence de cette population de cellules T a été montrée durant différentes infections intracellulaires avec des virus, des bactéries et des parasites, suggérant que ces lymphocytes jouent un rôle important dans l'élimination des pathogènes intracellulaires (N. Kadowaki and Y.J. Liu, 2002). De plus, il a été montré que ces lymphocytes induits par l'IFN $\alpha$  ont des fonctions de T régulateurs *in vitro* (M.K. Levings, et al., 2001). La physiologie des cellules T produisant IFN $\gamma$  et IL-10 doit donc être plus clairement définie afin de mieux comprendre le rôle des pDC au cours de l'infection virale. Il a également été décrit que les pDC stimulées avec du CD40L produisent de l'IL-10 et induisent des lymphocytes T CD8 régulateurs qui inhibent une prolifération T via sa propre production d'IL-10 (M. Gilliet, et al., 2002).



**Schéma 9** : Les pDC, stimulées avec trois stimuli différents, se différencient en DC induisant la différenciation de lymphocytes T CD4 différents, d'après N. Kadowaki and Y.J. Liu, 2002.

Ces résultats suggèrent que, malgré leur panel restreint de TLR, les pDC sont associées à de nombreux types de réponses immunitaires par leur capacité à influencer la différenciation T. Les pDC peuvent entraîner une réponse Th1 ou Th2 en fonction de leur stimulation. La situation physiologique dans laquelle l'IL-3 induit des pDC générant une réponse Th2 est encore mal connue. L'IL-3 peut être produite par plusieurs types cellulaires et notamment les mastocytes. Ces cellules, présentes en grand nombre dans la peau et les muqueuses, pourraient produire de l'IL-3 en réponse à un allergène ou à un parasite. Il a déjà été montré, en effet, que les DC sont recrutées dans la muqueuse nasale suite à une exposition à un allergène (F.L. Jahnsen, et al., 2001). Les pDC seraient donc impliquées dans la réponse allergique. De plus, dans certaines conditions, les pDC entraînent le développement de lymphocytes T CD4 et CD8 ayant des fonctions régulatrices et pourraient participer à la tolérance périphérique au soi (M. Gilliet, et al., 2002).

#### VII.1.2. Les cellules dendritiques générées *in vitro*.

La connaissance des DC humaines vient essentiellement de l'étude des DC générées *in vitro* à partir de précurseurs ou de DC immatures. Ces études ont notamment permis de déterminer l'ontogénie des DC chez l'homme.

Les précurseurs les plus précoces sont les cellules CD34<sup>+</sup> issues de la moelle osseuse ou du sang de cordon ombilical. Comme on l'a vu dans le paragraphe II, les cellules CD34<sup>+</sup> cultivées *in vitro* avec du GM-CSF et du TNF $\alpha$  peuvent être à l'origine de deux types de cellules aux caractéristiques de cellules de Langerhans et de DC interstitielles (tableau 1) (C. Caux, et al., 1996). La génération de cellules de Langerhans nécessite la présence de TGF $\beta$  (H. Strobl, et al., 1996). Ces cellules ont également été observées *in vivo* et leurs caractéristiques et fonctions sont résumées dans le tableau 1.



Une sous-population particulière de précurseurs lymphoïdes CD34<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> CD10<sup>+</sup> peut également se différencier en DC analogues à celles observées après différenciation de précurseurs lymphoïdes thymiques chez la souris (A. Galy, et al., 1995, D. Saunders, et al., 1996).

## **VII.2. Les sous-populations de cellules dendritiques chez la souris.**

### VII.2.1. Les cellules de Langerhans.

Les cellules de Langerhans forment un réseau dense de DC dans la peau. Elles ont un phénotype distinct des autres populations de DC. Elles expriment le CD11c, de forts niveaux de récepteurs Fc et des niveaux intermédiaires de CD86 et de CD40. Elles expriment comme chez l'homme un marqueur spécifique, la langérine, et possèdent des granules de Birbeck, organelle intracellulaire lié à la présentation de l'antigène. Ces cellules sont négatives pour le LFA-1 et le CD8 (F. Anjuere, et al., 1999). Les cellules de Langerhans acquièrent une expression intermédiaire du CD8 après stimulation avec le CD40L *in vitro* (F. Anjuere, et al., 2000) et *in vivo* les DC langérines positives retrouvées dans les ganglions expriment faiblement le CD8 (S. Henri, et al., 2001). La forme mature des cellules de Langerhans dans les ganglions se caractérise par une forte expression du CMH de classe II, des molécules de costimulation et du CD205. Ces cellules possèdent les mêmes fonctions que les DC lymphoïdes de la souris (N. Romani, et al., 1989). Cependant, elles se distinguent des DC CD8<sup>+</sup> par leur faible expression de la molécule CD8 et leur renouvellement très lent. Il semble en fait que les cellules de Langerhans quand l'organisme est au repos sont renouvelées par des précurseurs présents dans la peau. Cependant, ce mécanisme change au cours de l'inflammation et les cellules de Langerhans sont alors renouvelées via des précurseurs sanguins (M. Merad, et al., 2002). De plus, les cellules de Langerhans représentent 25% des

DC des ganglions de la peau (S. Henri, et al., 2001) ce qui suggère qu'elles migrent constitutivement de la peau vers ces organes lymphoïdes.

## VII.2.2. Les cellules dendritiques des organes lymphoïdes.

### a. Définition.

Les sous-populations de DC chez la souris ont été plus faciles à identifier que chez l'homme du fait de la disponibilité des tissus mais aussi de l'expression de certains marqueurs. Les DC des organes lymphoïdes expriment toutes le CD11c et sont positives pour les molécules du CMH de classe II et les molécules de costimulation CD80, CD86 et CD40. L'augmentation de ces molécules, après culture des DC, suggère qu'elles possèdent un phénotype relativement immature. Toutefois, elles entraînent une forte prolifération des lymphocytes T allogéniques *in vitro*. Les sous-populations de DC sont définies dans les organes lymphoïdes chez la souris par l'expression des molécules CD8 et CD4 (D. Vremec, et al., 2000). La fonction de ces marqueurs, s'il y en a une, n'est pas encore connue et le CD8 est présent sur les DC sous la forme d'un homodimère  $\alpha\alpha$  (D. Vremec, et al., 1992), contrairement aux lymphocytes qui expriment l'hétérodimère CD8  $\alpha\beta$ . La fonctionnalité du marqueur CD8 a été évaluée par plusieurs équipes dans des modèles de souris déficientes en CD8. Cependant, la population de DC CD8<sup>+</sup> dans la rate, définie alors par son expression de DEC205, semble posséder les mêmes caractéristiques que les DC CD8<sup>+</sup> sauvages (H. Hochrein, et al., 2001). Les marqueurs DEC205 (CD205) et CD11b permettent également de définir des populations de DC.

Ces différents marqueurs permettent la définition de cinq sous-populations de DC dans les tissus lymphoïdes. La rate contient trois de ces sous-populations : la population CD4<sup>-</sup> CD8<sup>fort</sup> CD205<sup>fort</sup> CD11b<sup>-</sup> représente 20% des DC, la population CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> CD205<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> représente la population majoritaire dans la rate (60%), et la population CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> CD205<sup>-</sup>

CD11b<sup>+</sup> représente également 20% des DC (D. Vremec, et al., 2000). Ces trois populations sont généralement nommées CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup> ou double négative.

Le thymus contient essentiellement la population CD8<sup>+</sup> (70%), cependant il est difficile de déterminer réellement la proportion des différentes populations de DC car elles sont capables d'acquérir les molécules CD4 et CD8 des thymocytes (D. Vremec, et al., 2000). Ces DC semblent jouer un rôle important dans la tolérance centrale au soi. Toutefois, les mécanismes par lesquels les DC entraînent une délétion des lymphocytes T autoréactifs sont encore mal connus.

Les ganglions possèdent, en plus des trois populations de DC retrouvées dans la rate, deux populations venues via les vaisseaux lymphatiques. La population CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> CD205<sup>faible</sup> est présente dans les ganglions mésentériques et dans les ganglions drainant la peau. Elle pourrait correspondre à la forme mature des DC, à des DC issues de monocytes, ou à une forme mature des DC CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> spléniques (S. Henri, et al., 2001), ces connections n'étant pas mutuellement exclusives. Il existe également une population présente essentiellement dans les ganglions de la peau, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>faible</sup> CD205<sup>fort</sup> CD11b<sup>+</sup>, qui exprime également la langérine et de fortes quantités de CMH de classe II et de molécules de costimulation, qui correspondrait à la forme mature des cellules de Langerhans (S. Henri, et al., 2001). Les pDC ont également été décrits dans les ganglions chez la souris et constituent une sixième population de DC que l'on caractérisera dans le prochain paragraphe.

#### b. Caractéristiques et fonctions.

Les DC spléniques ont été les plus largement étudiées (tableau 4). Ces populations de DC expriment des niveaux équivalents de molécules de CMH et de molécules de costimulation dont l'expression est augmentée après culture. La culture des DC CD4<sup>+</sup> induit également la diminution de l'expression du marqueur CD4 et l'augmentation de CD205. Les

trois sous-populations de DC possèdent des phénotypes différents résumés dans le tableau 4. De manière générale, les DC CD8<sup>+</sup> expriment plus de molécules d'adhésion que les deux autres populations de DC. Il faut noter que le CD103, l'équivalent du marqueur OX62 spécifique des DC chez le rat, est exprimé par les DC CD8<sup>+</sup> et pourrait constituer un marqueur plus spécifique que le DEC205 pour cette population. Les trois populations de DC spléniques possèdent une morphologie non dendritique, corrélant avec leur phénotype immature, et un fort rapport nucléoplasmique. Leur localisation est plus controversée. En effet, il a d'abord été décrit que les DC CD8<sup>+</sup> étaient essentiellement présentes dans les zones T de la rate et les CD8<sup>-</sup> dans la zone marginale et la pulpe rouge (D. Vremec and K. Shortman, 1997). Cependant, d'autres études montrent que les DC CD8<sup>+</sup> spléniques sont fréquentes dans la pulpe rouge et la zone marginale et rares dans les zones T, tandis que les DC CD4<sup>+</sup> et double négatives sont présentes dans les zones T, la zone marginale et la pulpe rouge (A.D. McLellan, et al., 2002, C.R. Sousa, et al., 1997). Toutefois on observe une migration des DC spléniques dans les zones T après une stimulation microbiale *in vivo* (T. De Smedt, et al., 1996, C.R. Sousa, et al., 1997).

Les sous-populations de DC CD8<sup>+</sup> et CD8<sup>-</sup> possèdent des fonctions différentes en particulier au niveau de l'activation T et de la régulation de la réponse immune (tableau 4). Cependant, il est difficile d'étudier ces cellules *in vitro* car elles sont très sensibles à leur micro-environnement et les différentes études sont souvent contradictoires.

La production de cytokines par les DC est un élément majeur du contrôle du développement des cellules T par les DC. Les DC CD8<sup>+</sup> et CD8<sup>-</sup> de la rate induisent une prolifération équivalente des cellules T CD4<sup>+</sup> *in vitro* et *in vivo*. Cependant, ces sous-populations de DC engendrent une différenciation différente des cellules T *in vivo*. Il a tout d'abord été établi dans des modèles d'injection de DC chargées avec un peptide, que les DC CD8<sup>+</sup> induisent une différenciation Th1 des cellules T CD4, tandis que les DC CD8<sup>-</sup> induisent

une réponse de type Th2. Cette différence dans l'induction de la différenciation T est attribuée à la production d'IL-12 par les deux populations de DC. En effet, les DC CD8<sup>+</sup> sont les principales cellules productrices d'IL-12 comparées aux DC CD8<sup>-</sup> (R. Maldonado-Lopez, et al., 1999, B. Pulendran, et al., 1999). Depuis, ce concept a été controversé et plusieurs études montrent que la nature du pathogène ainsi que le stade de maturation des DC, plus que la population en elle-même, détermine la production de l'IL-12 par les DC (L.Y. Huang, et al., 2001, B. Pulendran, et al., 2001a). Il a été montré par exemple que les deux populations de DC fraîchement isolées induisent une réponse Th1 *in vitro* (A. Iwasaki and B.L. Kelsall, 2001). Il apparaît donc que les DC CD8<sup>+</sup> de la rate mais aussi des ganglions et du thymus (H. Hochrein, et al., 2001) sont les DC les plus susceptibles de produire de l'IL-12 en grande quantité, cependant cette production n'est pas systématique et dépend du pathogène. La production d'IL-12 peut également être attribuée aux DC CD8<sup>-</sup> et elle est régulée négativement par l'IL-10 (L.Y. Huang, et al., 2001) et positivement par l'IL-4 (H. Hochrein, et al., 2000).

Les DC CD8<sup>+</sup> sont également capables de produire de faibles quantités d'IFN $\alpha$  et  $\beta$ , cytokines induisant une réponse Th1, après avoir été stimulées avec des CpG et du poly(I:C) (H. Hochrein, et al., 2001). Cette production d'IFN $\alpha$  les a longtemps assimilées aux cellules plasmacytoïdes. Récemment, ces cellules ont été identifiées dans les organes lymphoïdes et le sang chez la souris (C. Asselin-Paturel, et al., 2001) comme on le verra plus loin. Les DC CD8<sup>+</sup> peuvent donc participer à l'immunité anti-virale mais elles ne correspondent pas aux DC plasmacytoïdes chez la souris. Les autres populations de DC spléniques produisent également des cytokines particulières *in vitro*. La population CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> est la principale productrice d'IFN $\gamma$  en présence d'IL-12 et d'IL-18 exogènes (H. Hochrein, et al., 2001) tandis que les DC CD4<sup>+</sup> qui sont de faibles productrices des IFN peuvent produire de l'IL-10 en réponse à certains pathogènes *in vitro* (A.D. Edwards, et al., 2002). Les différentes

populations de DC influencent également la quantité de cytokines produites par les cellules T. La population CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> induit plus d'IL-2, d'IFN $\gamma$  par les T CD4 et CD8 que la population CD8<sup>+</sup> alors qu'elles induisent une prolifération équivalente des cellules T (V. Kronin, et al., 2001, V. Kronin, et al., 2000).

Une autre différence entre les sous-populations de DC spléniques est la capacité à faire proliférer les lymphocytes T CD8. En effet, les cellules CD8<sup>+</sup> entraînent une faible prolifération *in vitro* des lymphocytes T CD8 naïfs ou allogéniques activés, en comparaison aux DC CD8<sup>-</sup>. Cette inefficacité n'est pas due à une induction d'apoptose ou d'anergie des cellules T CD8 par les DC et la maturation des DC CD8<sup>+</sup> n'a aucun effet sur leur prolifération. De plus, les DC CD8<sup>+</sup> ont une stabilité de leurs molécules de CMH de classe I équivalente à celle des DC CD8<sup>-</sup> (A.D. McLellan, et al., 2002). Il a été montré que les DC CD8<sup>+</sup> pouvaient contrôler la prolifération des cellules T CD8 en limitant leur production d'IL-2 (V. Kronin, et al., 1996). Paradoxalement, les DC CD8<sup>+</sup> semblent être spécialisées dans la cross-présentation d'antigènes *in vivo* et seules les DC CD8<sup>+</sup> réalisent une présentation croisée et stimulent les cellules T CD8 après l'injection d'ovalbumine associée à des cellules (J.M. den Haan, et al., 2000, J.L. Pooley, et al., 2001). Ces résultats sont peu controversés et la spécialisation des DC CD8<sup>+</sup> pour la cross-présentation semble réelle *in vivo*. Il a été montré récemment que les deux populations de DC CD8<sup>+</sup> et CD8<sup>-</sup> sont capables de cross-présenter des complexes immuns. Cependant, cette présentation croisée est dépendante des récepteurs Fc $\gamma$ RI et Fc $\gamma$ RIII pour les DC CD8<sup>-</sup> tandis qu'elle est constitutive et ne dépend pas d'un signal d'activation supplémentaire pour les DC CD8<sup>+</sup>. De plus la présentation croisée réalisée par les DC CD8<sup>+</sup> semble indépendante des récepteurs CD36 et des intégrines  $\alpha\beta$ 3 et  $\alpha\beta$ 5, ce qui renforce la notion de deux voies de présentation différentes entre les sous-populations de DC (O. Schulz, et al., 2002). Cette présentation croisée, en l'absence de signal de maturation des DC CD8<sup>+</sup> entraîne une tolérance des cellules T (J.M. den Haan and M.J. Bevan, 2002). De

plus, il a été montré que les DC CD8<sup>+</sup> entraînent une apoptose précoce des T CD4 en culture (G. Suss and K. Shortman, 1996) cependant ces résultats n'ont pas été reproduits et sont très controversés. La signification *in vivo* de ce phénomène n'est pas encore claire mais la population de DC CD8<sup>+</sup>, bien qu'elle soit capable d'induire l'immunité, pourrait être spécialisée dans l'induction de lymphocytes T tolérogéniques ou régulateurs. Cette fonction *in vivo* a déjà été observée dans différents modèles et notamment, il a été montré que les DC CD8<sup>+</sup> pouvaient diminuer la réponse anti-donneur et prolonger la survie d'une greffe allogénique de cœur chez la souris (P.J. O'Connell, et al., 2002). De plus ces cellules, présentes dans les zones T, possèdent des complexes CMH : peptides du soi (K. Inaba, et al., 1997). Il a été récemment montré que ces cellules cross-présentent des antigènes de tissus périphériques comme les cellules  $\beta$  du pancréas et induisent une tolérance des CTL autoréactifs par délétion dans les ganglions drainant. Ce phénomène de cross-tolérance implique donc largement les DC CD8<sup>+</sup> dans la tolérance périphérique au soi (G.T. Belz, et al., 2002).

Population	CD4- CD8+	CD4- CD8-	CD4+ CD8-	DC plasmacytoïdes
<b>Phénotype</b>	CD8+ CD4- CD205+ CD11c++ CD11b- B220-/+ Gr-1- Langerine ++ CMH cl II + CD80+/- CD86+ CD40++ CD54+ CD62L++ CD103++ CD123-	CD8- CD4- CD205+ CD11c++ CD11b+ B220-/+ Gr-1- Langerine- CMH cl II + CD80+/- CD86+ CD40+ CD54+ CD62L+ CD103- CD123-	CD8- CD4+ CD205- CD11c++ CD11b+ B220-/+ Gr-1- Langerine- CMH cl II + CD80+/- CD86+ CD40+ CD54+ CD62L+ CD103- CD123-	CD8- CD4+ CD205+/- CD11c+/- CD11b- B220+ Gr-1+ Langerine- CMH cl II + CD80- CD86+/- CD40+/- CD54++ CD62L+/- ? CD123-
<b>Expression des TLR</b>	TLR 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9	TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9	TLR 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9	TLR 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9
<b>Localisation</b>	zones T, zone marginale, pulpe rouge de la rate	pulpe rouge, zone marginale de la rate	pulpe rouge, zone marginale de la rate	zone marginale de la rate, sang, moelle osseuse thymus
<b>Fonctions</b>				
Capture de l'antigène	+	++	++	-
- Sécrétion d'IL-12	+++		+/-	+
- Sécrétion d'Infa/β	+	-	-	+++
- Priming TCD4	+++	+++	+++	+
- Priming TCD8	+	+++	+++	+
- Cross priming	+++	-	+/-	?
- Différentiation Th1	++	+/-	+/-	+
- Différentiation Th2	+/-	+/-	+/-	+/-

**Tableau 4 :** caractéristiques des sous-populations de DC chez la souris, modifié d'après B. Pulendran, et al., 2001a.

L'appartenance à une lignée lymphoïde ou myéloïde de ces populations ne semble pas déterminer leur ségrégation en sous-populations. Cependant, les différentes populations de DC présentes dans les organes lymphoïdes et en particulier dans la rate, semblent représenter différentes lignées de développement comme l'ont montré Kamath et al. (A.T. Kamath, et al., 2000). Ceci explique également que les cytokines et les facteurs de transcription nécessaires



au développement de ces DC sont différents entre les populations CD8<sup>+</sup> et CD8<sup>-</sup> (L. Wu, et al., 1998, L. Wu, et al., 1997).

### VII.2.3. les précurseurs de cellules dendritiques.

La découverte de précurseurs potentiels des DC chez la souris renforce la notion de l'existence de lignées différentes de DC et permet des comparaisons directes entre les DC de l'homme et de la souris.

#### a. Les monocytes.

Chez la souris certains monocytes du sang CD45RA<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> peuvent se différencier en DC matures *in vitro*, sous l'influence du GM-CSF et du TNF $\alpha$  (M.W. Schreurs, et al., 1999) Ces DC générées *in vitro* correspondraient aux DC dites DC1 chez l'homme. La différenciation du monocyte en DC a également été étudiée *in vivo* après injection de billes de latex fluorescentes. Il a été montré que les monocytes ayant phagocyté les billes migrent dans les ganglions lymphatiques où ils ont alors été identifiés comme des DC matures CD11c<sup>low</sup> et CD8<sup>-</sup> (G.J. Randolph, et al., 1999). Cependant, en l'absence de tout signal de danger, ce type de DC représente une quantité infime des cellules des ganglions et il est probable que la différenciation des monocytes en DC *in vivo* dépende d'un stimulus exogène de phagocytose.

#### b. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes.

Les précurseurs, équivalents des pDC chez l'homme, ont été identifiés plus récemment chez la souris, dans les organes lymphoïdes (C. Asselin-Paturel, et al., 2001, P. Bjorck, 2001, H. Nakano, et al., 2001) et dans le sang (M. O'Keeffe, et al., 2002b). Ces cellules possèdent de nombreuses caractéristiques communes avec les DC plasmacytoïdes humaines (pré-DC2). Le

FLT3-L semble fondamental dans le développement des pDC de la souris et les pDC peuvent être générées *in vitro* à partir de cellules de moelle osseuse cultivées en présence de FLT3-L seul (M. Gilliet, et al., 2002). Les pDC murines n'expriment pas de marqueurs T, B ni le CD14 et le CD11b. Cependant, elles se distinguent des pDC humaines par des différences d'expression notables de certains antigènes (tableau 4 et 3). En effet, les pDC chez la souris, comme toutes les DC murines, expriment le CD11c. Ce marqueur myéloïde est faiblement exprimé par les pDC extraites des organes lymphoïdes et fortement exprimé par les pDC générées *in vitro* (B. Blom, et al., 2000, M. Gilliet, et al., 2002). De plus les pDC de la souris sont négatives pour le récepteur à l'IL-3 (CD123) qui est un marqueur des pDC humaines permettant de les purifier et induisant leur survie. Elles expriment également le CD45RA (B220) et le Ly6G-C (GR-1) qui sont des marqueurs des lymphocytes B et des granulocytes respectivement. L'expression de ces marqueurs a longtemps masqué la présence des pDC puisqu'ils étaient couramment utilisés pour éliminer les cellules non DC chez la souris. L'expression de la molécule CD8 peut être positive ou négative dans les pDC issues de la rate et est négative dans les pDC générées *in vitro* (H. Hochrein, et al., 2002). L'expression de la molécule CD8 est, cependant, consensuellement observée dans les pDC après maturation *in vitro* ou *in vivo* (C. Asselin-Paturel, et al., 2001, M. O'Keeffe, et al., 2002a). Cette expression de CD8 par les pDC semble spécifique de l'espèce car elle n'est jamais retrouvée sur des DC chez l'homme. La maturation des pDC entraîne une augmentation des molécules de CMH de classe II et de costimulation. Les pDC matures ont alors un phénotype proche des DC CD8<sup>+</sup> spléniques qui pourrait être la forme mature des pDC dans la rate. Cependant, plusieurs arguments s'opposent à cette théorie. La déplétion du CD4, exprimé par les pDC, n'entraîne pas la déplétion des DC CD8<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> (A.T. Kamath, et al., 2000). De plus, les deux populations de DC ne semblent pas avoir la même durée de vie (A.T. Kamath, et al., 2000) et enfin les DC

CD8<sup>+</sup> sont observées en l'absence de tout stimulus de maturation, ce qui n'est pas le cas pour les pDC matures. Il est donc peu probable que les pDC soient les précurseurs des DC CD8<sup>+</sup>.

Comme chez l'homme, les pDC sont de très grandes productrices d'IFN de type I après une stimulation virale ou avec des CpG. L'expression des TLR sur les pDC de souris n'est pas encore clairement définie. Une forte production de cytokines est observée en réponse à la stimulation par le TLR7 (H. Hochrein, et al., 2002) et TLR9 (C. Asselin-Paturel, et al., 2001, P. Bjorck, 2001) tandis qu'elles répondent faiblement à la stimulation via les ligands des TLR 2, 3 et 4 (H. Hochrein, et al., 2002, M. O'Keeffe, et al., 2002a). Il semble qu'elles expriment de grandes quantités de TLR7 et de TLR9, cependant, contrairement à ce qui est observé chez l'homme, l'expression du TLR9 n'est pas restreint aux pDC. Après stimulation, les pDC sont capables de produire de l'IFN $\alpha$ , mais aussi de l'IL-6 (M. O'Keeffe, et al., 2002a) et de l'IL-12. La production d'IL-12 est controversée chez l'homme, tandis qu'elle est clairement observée chez la souris, après stimulation avec du SAC, le virus influenza ou des CpG (C. Asselin-Paturel, et al., 2001, P. Bjorck, 2001).

Les pDC sont impliquées dans la réponse innée et en particulier dans la réponse antivirale du fait de leur forte production d'IFN de type I en réponse à un virus. L'IFN $\alpha$  produit par les pDC amplifie la réponse inflammatoire et protège les cellules d'une infection virale. Il permet également de réguler la production d'IL-12 par les populations de DC CD11b<sup>+</sup> (M. Dalod, et al., 2002) et régule donc la réponse immunitaire.

Le rôle des pDC de souris dans l'immunité acquise et notamment dans la différenciation des lymphocytes T CD4 a également été étudié. Comme les autres populations de DC isolées de la rate chez la souris, on observe une grande plasticité de ces cellules. Après stimulation, les pDC acquièrent un phénotype de DC matures et une forte capacité à stimuler les lymphocytes T. Les pDC matures expriment également la molécule CCR7 qui leur permettra de migrer dans les ganglions lymphatiques (P. Martin, et al., 2002). Il a été montré

que, via l'IL-12, les pDC stimulées avec des CpG étaient capables d'induire une différenciation Th1 des lymphocytes T CD4. Cependant, l'induction d'une différenciation de T helper est dépendante de nombreux facteurs environnementaux et il a été montré, par exemple, que les pDC soumises à une forte dose d'antigène induisent une différenciation Th1 tandis qu'une faible dose d'antigène induit des lymphocytes Th1 et Th2 (A. Boonstra, et al., 2003).

En l'absence de toute stimulation, les pDC sont des faibles stimulatrices de la prolifération des lymphocytes T et il a été montré qu'elles induisent des lymphocytes T régulateurs dans ces conditions (P. Martin, et al., 2002). Les pDC présentes dans les organes lymphoïdes secondaires pourraient donc jouer un rôle dans la tolérance au soi périphérique. Le rôle tolérogénique des pDC est conforté par une étude des pDC de foie montrant que ces cellules induisent une prolongation de survie d'une greffe allogénique de cœur après transfert (L. Lu, et al., 2001).

### **VII.3. Les sous-populations de cellules dendritiques chez le rat.**

L'étude des DC chez le rat a progressé plus lentement que chez la souris du fait du manque de réactifs spécifiques et de l'absence d'animaux transgéniques.

Les DC chez le rat ont été décrites dans tous les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes (D.N. Hart and J.W. Fabre, 1981). L'ontogénie des DC chez le rat est très mal connue mais l'on sait que les cellules de moelle osseuse peuvent se différencier en DC sous l'influence du GM-CSF et de l'IL-4 (M. Talmor, et al., 1998) comme chez la souris (K. Inaba, et al., 1992). L'étude des DC de rat dans les organes lymphoïdes secondaires associés à l'intestin (plaque de Peyer, lamina propria, ganglions mésentériques) montre que ces DC ont un phénotype homogène pour l'expression des molécules de CMH II et l'OX62, marqueur spécifique des DC chez le rat et sont hétérogènes pour l'expression des marqueurs Thy.1, CD2, CD25,

CD11b (L.M. Liu and G.G. MacPherson, 1995). Toutefois une étude précise des différentes populations de DC n'a pas été réalisée dans ces organes. Au contraire, les DC de la lymphe ont été largement étudiées par le groupe de Mc Pherson. Les DC de la lymphe sont collectées dans le canal thoracique d'animaux dont les ganglions mésentériques ont été retirés (C.W. Pugh, et al., 1983). Ces DC se divisent en deux populations une  $CD4^+/ SIRP\alpha^+$  et une  $CD4^-/ SIRP\alpha^-$ . Ces sous-populations de DC expriment la même quantité de CMH de classe II, d'ICAM-1, de CD11b/c et d'OX62 mais ont des fonctions différentes. En effet les DC  $CD4^+$  stimulent de manière plus importante la prolifération de cellules T allogéniques en MLR et des cellules T spécifiques d'un antigène *in vitro* et *in vivo* (L. Liu, et al., 1998). D'autres populations de DC ont été identifiées dans des organes non lymphoïdes et il est impossible de faire une corrélation entre ces populations et les DC de la lymphe. Il a été montré par exemple que les DC des voies respiratoires sont capables d'induire une réponse Th2 des lymphocytes *in vitro* lorsqu'elles sont chargées avec de l'OVA. De plus, les mêmes DC transférées *in vivo* induisent une réponse Th2 des cellules T tandis que la présence de GM-CSF influence une différenciation Th1 et Th2 des cellules T. (P.A. Stumbles, et al., 1998). Ceci suggère que les DC de la muqueuse respiratoire puissent jouer un rôle dans la réponse allergique comme il a récemment été montré chez la souris (S.C. Eisenbarth, et al., 2002). Les DC du foie ont également été décrites chez le rat. Ces DC sont capables d'acquérir des antigènes du sang dans les sinusoides hépatiques et de les présenter dans les ganglions lymphatiques coeliaques (K. Matsuno and T. Ezaki, 2000). Dans la rate et dans le thymus, notre groupe a mis en évidence que les DC exprimaient la molécule NKRP-1 et que seules les DC spléniques possédaient une activité cytotoxique directe contre une lignée de cellules YAC-1, habituellement utilisée pour tester la cytotoxicité des cellules NK. Cette activité cytotoxique des DC de la rate est dépendante du  $Ca^{2+}$ . Ceci suggère un mécanisme de lyse via le système granzyme perforine, cependant la signification de cette activité cytotoxique *in vivo* n'est pas

encore connue (R. Josien, et al., 1997). Les DC thymiques possèdent également différentes populations de DC exprimant de manière hétérogène les marqueurs CD4, CD8, CD25 et OX44. Trois sous-populations ont été définies dans le thymus, dont une pourrait jouer un rôle dans l'induction de la tolérance centrale au soi (A. Vicente, et al., 1994). Les populations de DC thymiques sont difficiles à analyser car elles sont capables d'acquérir des molécules exprimées par les thymocytes. On sait maintenant que les DC chez le rat n'expriment pas le marqueur CD8 contrairement à ce qui est décrit chez la souris.

#### **VII.4. La plasticité des cellules dendritiques.**

Comme on l'a vu au cours des derniers paragraphes, la plasticité des DC est très large et ne dépend pas uniquement de la sous-population de DC en elle-même. Cette plasticité se traduit essentiellement par l'induction de la différenciation des lymphocytes T CD4 de type Th1 et Th2 et plus particulièrement par la production d'IL-12 par les DC. Plusieurs paramètres peuvent influencer la réponse immune induite par les DC.

De nombreuses sous-populations de DC peuvent, quand elles sont stimulées de manière appropriée, produire de l'IL-12 et/ou de l'IFN et induire une réponse de type Th1. (H. Hochrein, et al., 2000, M.C. Rissoan, et al., 1999, E.C. de Jong, et al., 2002, M. Cella, et al., 2000). De plus, l'IL-12 est induite par de nombreux types de pathogènes et sa production est augmentée par le CD40L. Cependant, une même sous-population de DC stimulée différemment *in vitro* peut induire des réponses différentes, par exemple les DC dérivées des monocytes produisent de l'IL-12 quand elles sont stimulées avec du CD40L (M. Cella, et al., 1996) mais induisent une réponse Th2 quand elles sont stimulées avec la molécule PGE2 (P. Kalinski, et al., 1999). De la même manière les pDC induisent une réponse Th2 en présence d'IL-3 (M.C. Rissoan, et al., 1999) mais génèrent une réponse de type Th1 lorsqu'elles sont

stimulées avec un virus (M. Cella, et al., 2000). Il est maintenant clair que les facteurs du micro-environnement influencent les DC et qu'ils peuvent être à l'origine d'une différenciation Th2 via leur action sur les DC. C'est le cas pour la prostaglandine E2, le TGF $\beta$ , l'IL-1 ou le TNF $\alpha$  (Y.J. Liu, et al., 2001). Récemment, il a également été montré que les DC activées avec la molécule TSLP (thymic stromal lymphopoetin) induisent la différenciation de lymphocytes T produisant de l'IL-4, de l'IL-13 et de l'IL-5 (V. Soumelis, et al., 2002). In vivo, c'est la nature du pathogène et de l'environnement qui influence les DC de manière directe. La plus belle illustration de ce phénomène a été réalisée par Fé d'ostiani et al. qui ont montré que le champignon *Candida albicans* sous sa forme levure induit la production d'IL-12 par les DC et une induction d'une réponse protectrice Th1 in vitro et in vivo. Le même champignon sous sa forme filamentaire non virulente induit les DC à produire de l'IL-4. Les DC sont donc des traducteurs du micro-environnement qui induisent la réponse adaptée au type de pathogènes. Il a été montré que des DC stimulées avec des pathogènes différents régulent différemment de nombreux gènes ce qui implique que les DC, en fonction du pathogène, entrent dans un programme de maturation spécifique qui modifiera son phénotype (L.Y. Huang, et al., 2001). Les mécanismes permettant l'orientation de la réponse par les DC ne sont pas encore clairs. Les TLR, les récepteurs des PAMP présents sur différentes sous-populations de DC, sont des inducteurs d'une réponse Th1 via les DC. Il est donc possible que l'absence d'un TLR sur une population de DC entraîne une incapacité de production d'IL-12 en réponse au pathogène spécifique et une incapacité à engendrer une réponse de type Th1.

La dose d'antigène peut également influencer la réponse immunitaire via les DC. Il est alors possible que, suivant la quantité de molécules de CMH de classe II présente à la surface de la DC, la dose d'antigène soit différente. Une faible dose d'antigène entraîne généralement une réponse de type Th2 (A. Boonstra, et al., 2003).

L'environnement tissulaire des DC influence également la différenciation T qu'elles induisent et les DC purifiées dans les plaques de Peyer chez la souris sont capables d'induire la différenciation de lymphocytes T produisant de l'IL-4 et de l'IL-10, contrairement aux DC spléniques (A. Iwasaki and B.L. Kelsall, 1999).

Le ratio lymphocytes T:DC (H. Tanaka, et al., 2000) et/ou la durée de stimulation des DC peuvent également moduler la polarisation des cellules T CD4. En effet, des DC stimulées de manière prolongée avec du LPS, diminuent leur production d'IL-12 en réponse au CD40L. Ces DC *exhausted* favorisent la différenciation des lymphocytes Th2 ou des lymphocytes Th0, exprimant le CCR7, et appelés lymphocytes T mémoires centraux (A. Langenkamp, et al., 2000).

Les DC permettent ainsi une réponse immune adaptée aux pathogènes en intégrant les différentes composantes de l'environnement. Elles apparaissent donc comme des cellules à la plasticité illimitée induisant une réponse innée et adaptative adaptée au type de pathogènes et aux conditions environnementales. Cette plasticité des DC se traduit par l'induction de la différenciation de lymphocytes T très différents : Th1 comme Th2, mémoires et cytotoxiques, mais également, comme on le verra, la plasticité des DC leur permet de générer l'immunité ou la tolérance.

## **VIII. Cellules dendritiques et tolérance.**

Les deux termes cellules dendritiques et tolérance peuvent paraître contradictoires. Cependant, bien que les DC soient des cellules essentielles dans l'induction de l'immunité adaptative et innée, elles jouent un rôle important dans l'induction de la tolérance au soi.



### **VIII.1. La tolérance centrale.**

Dans le thymus, les lymphocytes T autoréactifs de haute affinité qui ont passé l'étape de sélection positive subissent un processus de délétion (sélection négative) lorsqu'ils pénètrent dans la jonction cortico-médullaire et la médullaire. La présence des DC dans la médullaire suggèrent qu'elles participent à l'établissement de la tolérance centrale. Plusieurs expériences ont montré que les DC thymiques pouvaient rendre tolérants des lymphocytes. Par exemple, l'ajout de DC allogéniques à une culture de cellules fœtales thymiques induit une tolérance de ces cellules vis à vis des cellules du donneur mais pas contre un tiers (P.J. Fairchild and J.M. Austyn, 1990). De plus, il a été montré que les DC thymiques pouvaient tolérer des cellules T pour un antigène du soi dans un modèle de culture comprenant des DC chargées en C5 (protéine soluble du complément) et des thymocytes transgéniques pour les TCR reconnaissant cette molécule (T. Zal, et al., 1994). Le rôle des DC thymiques dans la sélection négative, mais pas dans la sélection positive, a été confirmé in vivo par des travaux utilisant des souris transgéniques présentant une expression ciblée des molécules du CMH de classe II sur les DC (T. Brocker, et al., 1997). Il semble donc que ce soit via les complexes CMH / peptides que les DC induisent une tolérance. Cependant les mécanismes de ce processus ne sont pas encore connus. De plus d'autres cellules présentatrices de l'antigène semblent impliquées dans la délétion des lymphocytes auto-réactifs comme les macrophages, les lymphocytes B et les cellules épithéliales thymiques (P. Hugo, et al., 1994, J. Sprent, et al., 1988).

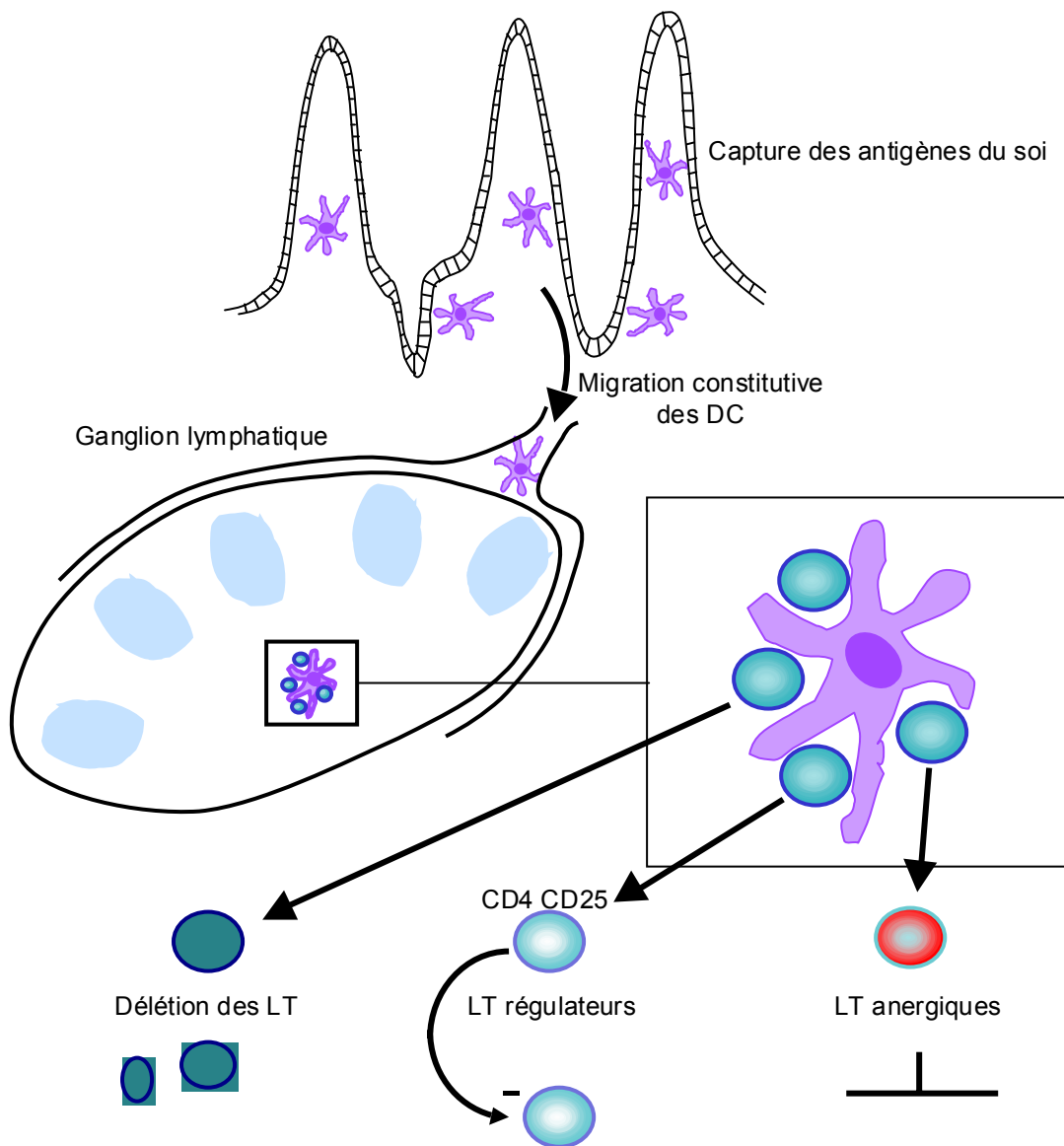
### **VIII.2. La tolérance périphérique**

La tolérance centrale est efficace mais imparfaite (C. Bouneaud, et al., 2000) et certains lymphocytes T auto-réactifs vont gagner la périphérie. En effet, certains auto-antigènes ne sont jamais exprimés dans le thymus ou ne sont exprimés dans l'organisme que

tardivement, c'est à dire après que le répertoire T soit établi. Des mécanismes de tolérance périphérique sont donc nécessaires pour éviter les réactions auto-immunes. Les lymphocytes T autoréactifs peuvent être rendus tolérants par induction d'anergie, par délétion ou par l'action de cellules T dites régulatrices ou suppressives. Les mécanismes de tolérance périphérique sont importants dans les sites d'infection où les DC qui mûrissent présentent à la fois des peptides exogènes et des peptides du soi.

Des travaux récents suggèrent que les DC jouent un rôle important dans la tolérance périphérique mais les mécanismes précis restent mal connus (R.M. Steinman and M.C. Nussenzweig, 2002) (schéma 10). L'hypothèse dominante est que des DC immatures circulent en permanence des tissus vers les organes lymphoïdes et y transportent des auto-antigènes tissulaires capturés probablement par phagocytose de cellules apoptotiques dans les tissus (R.M. Steinman, et al., 2000). Ainsi les DC immatures utiliseraient leur capacité de cellules présentatrices de l'antigène pour maintenir la tolérance périphérique au soi (R.M. Steinman and M.C. Nussenzweig, 2002, R.M. Steinman, et al., 2000). L'état de maturation des DC est donc capital dans le contrôle de la fonction des DC. Il a été montré que les antigènes dérivés de cellules apoptotiques pouvaient être présentés par des DC immatures sans induire leur maturation, ce qui confirme cette hypothèse (S. Gallucci, et al., 1999, K. Inaba, et al., 1998). De plus, il a été montré en particulier que des DC immatures dérivées des monocytes entraînent la différenciation, chez l'homme, de cellules T régulatrices (M.V Dhodapkar, et al., 2001). Toutefois, ce concept a été nuancé par des études montrant que la maturation des DC est nécessaire pour induire une tolérance (M.L. Albert, et al., 2001) par exemple, la molécule CCR7 est exprimée par ces DC immatures et permet leur migration dans les organes lymphoïdes (I. Verbovetski, et al., 2002). Ces DC immatures tolérogènes qui migrent dans les organes lymphoïdes en l'absence de tous signaux de danger ont été appelées DC semi matures ou DC quiescentes. Une autre hypothèse suggère que la fonction tolérogène des DC est

assumée par certaines sous-populations de DC immatures particulières. En effet, il a été montré chez la souris que les antigènes des cellules pancréatiques  $\beta$  sont cross présentés de manière tolérogène par les DC  $CD8^+$  dans les ganglions (G.T. Belz, et al., 2002). De la même manière une population de DC particulière chez le rat  $CD4^- SIRP\alpha^-$  transportent des corps apoptotiques de cellules intestinales épithéliales vers les ganglions (F.P. Huang, et al., 2000).



**Schéma 10** : Induction de la tolérance périphérique au soi par les cellules dendritiques immatures

Les mécanismes par lesquels les DC acquièrent les antigènes du soi ne sont pas encore totalement élucidés, en revanche plusieurs types de lymphocytes T tolérants sont induits par les DC et la nature des DC induisant la délétion des cellules T, l'anergie ou des lymphocytes T régulateurs a été étudiée. Les DC immatures sont capables d'induire l'anergie des cellules T et ce processus a également été mis en évidence in vivo (Hawiger JEM 2001 Finkelman 96 JI). Il a été également montré que les DC qui présentent l'antigène en l'absence de molécules de costimulation induisent une anergie des lymphocytes T (R.H. Schwartz, et al., 1989). Ce processus pourrait avoir lieu dans les tissus ou dans les organes lymphoïdes où les DC immatures n'expriment pas de molécules de costimulation et agirait sur les lymphocytes T naïfs circulant. De plus les lymphocytes T CD8 pourraient être anergisés par des cellules des tissus qui expriment uniquement les molécules de CMH de classe I. L'IL-10 semble jouer un rôle important dans l'induction de lymphocytes T anergiques par les DC. En effet il a été montré que l'ajout d'IL-10 sur des DC immatures inhibait leur différenciation terminale, ce qui se traduit par une diminution de l'expression des molécules de CMH de classe II et de costimulation et une diminution de la production de cytokines par rapport à des DC non traitées (H. Jonuleit, et al., 2001). De plus, plusieurs exemples montrent que des DC traitées avec de l'IL-10 génèrent des lymphocytes T anergiques. Par exemple, chez l'homme il a été montré que des DC traitées à l'IL-10 induisent l'anergie de lymphocytes T allospécifiques ou l'anergie de lymphocytes T CD4 et CD8 spécifiques d'antigènes de mélanomes (K. Steinbrink, et al., 1999, K. Steinbrink, et al., 1997). Il est donc possible que l'activité des DC puisse être modulée par des cytokines immunosuppressives qui convertissent les DC immatures en DC tolérogènes. En conclusion l'induction de l'anergie fait intervenir des DC immatures qui n'expriment pas de molécule de costimulation et qui sont induites par l'IL-10.

Les DC immatures sont également capables d'induire des cellules T régulatrices. McGuirek a montré l'induction de lymphocytes T régulateurs par des DC produisant de l'IL-

10 chez la souris (P. McGuirk, et al., 2002). Chez l'homme, l'induction de lymphocytes T régulateurs a été observée suite à des stimulations répétées avec des DC allogéniques immatures (H. Jonuleit, et al., 2000). Toutefois l'induction de lymphocytes T régulateurs par les DC semble faire intervenir des DC immatures qui ont migré et qui comme on l'a vu précédemment ont un phénotype semi mature (M.B. Lutz and G. Schuler, 2002). Ces DC se caractérisent par une expression de CCR7, par une forte expression des molécules de CMH de classe II et de molécules de costimulation et une faible production de cytokines (M.B. Lutz and G. Schuler, 2002). Il a été proposé que le  $TNF\alpha$  peut être responsable de la différenciation de telles DC et donc de l'induction de lymphocytes T régulateurs. Par exemple, il a été montré que des DC générées in vitro en présence de  $TNF\alpha$  et injectées à des souris sont capables d'induire des cellules T régulatrices et de prévenir ainsi l'EAE (M. Menges, et al., 2002). En conclusion, l'induction de lymphocytes T anergiques fait intervenir des DC immatures qui n'expriment pas de molécules de costimulation et qui peuvent être induites par l'IL-10 en revanche la différenciation de lymphocytes T régulateurs semble être provoquée par des DC semi mature qui ont migré dans les organes lymphoïdes en l'absence d'un signal de danger.

La délétion des lymphocytes par les DC a été suggérée au cours de la tolérance centrale mais peut avoir lieu également en périphérie (S. Webb, et al., 1990). Les DC pourraient être impliquées dans ce processus. En effet, il a été montré dans un modèle murin de cross présentation d'antigène de cellules de pancréas exprimant l'ovalbumine que les lymphocytes T CD8 spécifiques proliféraient puis étaient délévés via un mécanisme qui impliquerait Bim un membre de la famille pro-apoptotique de Bcl2. Il a également été suggéré que l'expression de FasL sur les DC entraînait l'apoptose de lymphocytes T CD4 activés cependant ces résultats n'ont pas été reproduits et demeurent controversés. D'autres études ont également démontré une activité cytotoxiques des DC contre des lignées tumorales

T in vitro (L. Lu, et al., 1997, A. Shibaki and S.I. Katz, 2001) cependant il n'existe aucune preuve de cette fonction des DC in vivo.

Les DC jouent donc un rôle capital dans le maintien de la tolérance au soi. De plus, il a été montré récemment que les DC, stimulées par leur TLR, pouvaient également bloquer l'effet suppresseur de cellules T régulatrices via leur production d'IL-6 et d'une molécule inconnue (C. Pasare, et al. 2003). Ces résultats confirment que les DC sont des cellules clefs dans le contrôle de l'immunité. Cependant, plusieurs éléments sont encore inconnus dans l'induction de tolérance par les DC et en particulier, les mécanismes moléculaires d'induction de la tolérance, les mécanismes de capture des antigènes du soi dans les tissus et la nature des DC tolérogènes restent à être déterminés.

## **IX. Les cellules dendritiques et l'immunothérapie anti-cancéreuse.**

L'utilisation de DC pour induire une réponse immune contre des antigènes tumoraux suscite actuellement un grand intérêt (F.O. Nestle, et al., 2000). L'absence de réponse immune efficace contre les antigènes tumoraux pourrait être en relation avec l'absence de molécules de costimulation sur les cellules tumorales, l'absence de DC matures au sein des tumeurs et à la production de molécules inhibitrices comme le TGF $\beta$ , l'IL10 ou le VEGF par certaines cellules tumorales. Toutefois, des travaux ont montré que plus les tumeurs sont infiltrées par des DC, meilleur est le pronostic (Y. Becker, et al., 1993).

L'analyse des mécanismes de présentation de l'antigène et de la stimulation par les DC a permis le développement de nouvelles stratégies d'immunothérapie anticancéreuse basées sur l'injection de DC chargées en antigènes tumoraux. Afin d'assurer un protocole de vaccination optimale, deux paramètres ont été étudiés avec attention : la préparation des DC et la source d'antigènes qui leur sont délivrés.

De manière générale, les DC utilisées dans ce type de traitement sont générées *ex vivo* à partir de monocytes ou de cellules CD34<sup>+</sup> (Banchereau, et al., 2000). Les sous-populations de DC générées et l'état de maturation de ces DC sont importants. En effet, il a été montré que l'injection de DC immatures dans des volontaires sains entraîne l'inhibition de la réponse des cellules T CD8 contre un peptide viral et l'induction de lymphocytes T régulateurs produisant de l'IL-10 (M.V. Dhodapkar, et al., 2001). Récemment, il a été montré que l'injection de FLT3L induisait une augmentation du nombre de DC *in vivo* (Pulendran, et al., 2000) et l'effet du FLT3L sur l'augmentation de la réponse à un vaccin anti-tumorale a été testé (M.A. Morse, et al., 2000). Cependant le type de maturation induisant la meilleure réponse anti-tumorale *in vivo* est encore inconnu. Les DC dérivées des monocytes et maturées avec le cocktail IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 et PGE2 (Prostaglandine E2) semblent les plus adaptées, du fait de leur homogénéité, de leur survie et de leur capacité à induire des réponses cytotoxiques *in vitro* et *in vivo* (G. Schuler, et al., 2003). De plus la PGE2 semble être un facteur important puisqu'il induit l'expression de la molécule CCR7, nécessaire à la migration des DC dans les ganglions lymphatiques (G. Schuler, et al., 2003).

Le but ultime de ces traitements est de créer un large répertoire d'antigènes tumoraux permettant une présentation à la fois aux cellules T CD4 et CD8. De nombreux systèmes ont été employés pour charger les DC avec des antigènes tumoraux : peptides, protéines recombinantes, exosomes, vecteurs viraux, ADN de plasmide et transfection d'ARN. Récemment, il a été mis en évidence que des antigènes tumoraux présentés sous forme de complexe immuns étaient présentés sur les molécules de CMH de classe II et de classe I par les DC (Y. Nagata, et al., 2002). La présentation de l'ensemble du répertoire des antigènes d'une tumeur donnée a également été explorée. En particulier, il a été montré que des DC chargées avec des antigènes issus d'une cellule tumorale apoptotique ou nécrotique présentent

les antigènes de la tumeur sur leur CMH de classe I et de classe II (L. Jenne, et al., 2000, F. Berard, et al., 2000).

Des protocoles de vaccination anti-tumorale ont été initiés dans différents modèles qu'il est difficile de comparer. Chez des patients atteints de cancer rénaux l'injection de DC dérivées des monocytes matures chargées avec de la KLH et des lysats de tumeurs autologues, il a été montré une réponse clinique dans dix patients sur dix-sept (L. Holtl, et al., 2002). Banchereau et al. ont également montré que sept patients atteints de mélanome sur dix-sept montraient une régression tumorale après un traitement avec des DC CD34+ chargées avec des antigènes tumoraux et de la KLH (J. Banchereau, et al., 2001). Les résultats de nombreux essais cliniques chez l'homme, mais également des études réalisées chez les animaux, montrent que les vaccinations avec des DC permettent l'induction d'une réponse immune et induisent des réponses cliniques encourageantes. Les DC apparaissent donc comme de puissants outils thérapeutiques.



## BUTS DE L'ETUDE

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, il existe plusieurs sous-populations de DC chez l'homme et chez la souris qui possèdent des phénotypes différents mais également des fonctions différentes leur permettant de contrôler et d'adapter la réponse lymphocytaire T. Il faut noter que chez le rat ces sous-populations de DC sont encore mal connues.

Il a été montré que les DC peuvent jouer un rôle important au cours de l'induction de la réponse immune et de la tolérance centrale et plus récemment leur rôle dans la tolérance périphérique a été suggéré. Cependant les mécanismes d'induction de la tolérance périphérique par les DC sont mal connus et deux hypothèses ont été suggérées pour expliquer l'implication des DC dans ce processus. La première propose que les DC tolérogènes correspondent aux DC immatures tandis que les DC matures seraient immunogènes. La deuxième hypothèse suggère que la tolérance périphérique puisse être assumée par une sous-population particulière de DC. Notre équipe a montré dans un modèle d'induction de tolérance à une greffe cardiaque par transfusion de sang spécifique du donneur chez le rat que les leucocytes passagers du greffon, et en particulier les DC, pouvaient être responsables de la tolérance. En effet, leur déplétion inhibe l'induction de tolérance ce qui suggère que les DC du donneurs présentes dans l'allogreffe soient nécessaires à l'induction de tolérance (R. Josien, et al., 1998). Ces résultats ont été également confirmés dans un autre modèle d'induction de tolérance par la molécule LF15-0195 dans lequel les animaux tolérants montrent une infiltration importante et prolongée des DC du donneur dans les greffons (E. Chiffolleau, et al., 2002). Sur la base de ces résultats notre équipe a initié un projet de recherche visant à caractériser les fonctions des DC dans la tolérance. Cette étude a été réalisée chez le rat qui est l'animal utilisé depuis de nombreuses années dans notre

laboratoire. Notre équipe a ainsi montré pour la première fois que les DC pouvaient avoir une activité cytotoxique de type NK contre certaines cibles tumorales (R. Josien, et al., 1997).

Les buts de cette étude ont été d'identifier et de caractériser les sous-populations de DC fraîches chez le rat et d'analyser les mécanismes et les rôles *in vivo* de la fonction cytotoxique des DC, ce qui constitue une première étape dans l'étude du rôle des DC dans l'induction de la tolérance.

La purification de DC fraîches, n'ayant subi aucune étape de culture, s'avérait nécessaire pour cette étude et la technique de purification des DC utilisée sera exposée dans une première partie.

Dans une deuxième partie, l'activité anti-tumorale des DC de rat sera traitée. Nous verrons que les organes lymphoïdes chez le rat contiennent plusieurs sous-populations de DC et que l'activité cytotoxique est restreinte à une sous-population de DC particulière dont le mécanisme de lyse des cellules tumorales n'est pas encore connu, et qui est capable de phagocytter ses cibles après les avoir tuées. D'autre part, nous identifierons une population de cellules aux caractéristiques de DC qui semble jouer un rôle dans l'induction d'une réponse anti-tumorale dans un modèle de tumeurs solides chez le rat.

Enfin, dans une troisième partie, nous étudierons le phénotype et les fonctions des sous-populations de DC spléniques identifiées précédemment mais aussi d'une nouvelle population de DC chez le rat que nous avons récemment identifiée dans la rate : les DC plasmacytoïdes. Nous verrons que ces populations de DC spléniques possèdent des fonctions *in vitro* et *in vivo* différentes en terme de production de cytokines, d'expression des TLR et de stimulation des cellules T.

# **RESULTATS**

## **I. Marqueurs et méthodes de purification des cellules dendritiques**

### **chez le rat.**

#### I.1. Marqueurs des cellules dendritiques chez le rat.

##### I.1.1. Marqueurs généraux.

L'identification des DC n'est pas facile. En effet, il n'existe pas chez le rat, ni chez l'homme ou chez la souris, de marqueurs connus qui reconnaissent toutes les DC et uniquement des DC. De manière générale, on utilise une combinaison de marqueurs qui permet d'identifier les DC et d'exclure d'autres cellules. La purification des DC est donc souvent associée à un test fonctionnel. Les DC expriment des molécules communes à d'autres leucocytes comme les molécules de CMH de classe I et de classe II, le CD45 et les molécules d'adhésion : le CD54 (ICAM-1), le CD11b et le CD11c qui est utilisé pour purifier les DC chez la souris. Les DC expriment également des molécules de costimulation comme les molécules B7 et le CD40, cependant l'expression de ces marqueurs ainsi que les molécules de CMH de classe II dépend du niveau de maturation de ces cellules. L'absence de marqueur spécifique des DC pose donc un réel problème pour la purification de ces cellules.

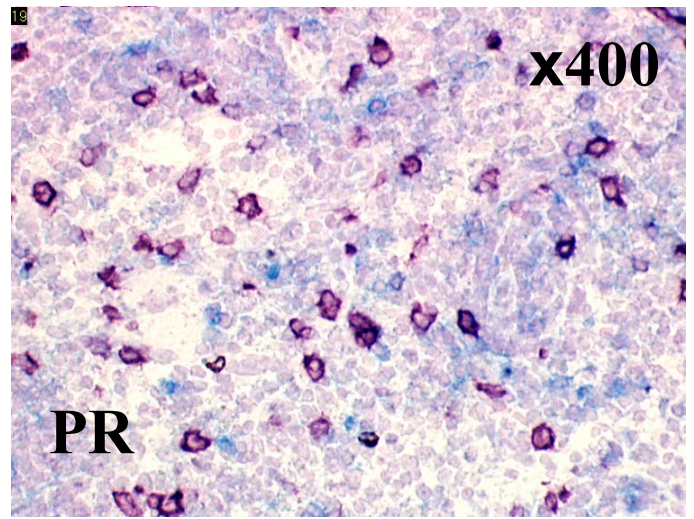
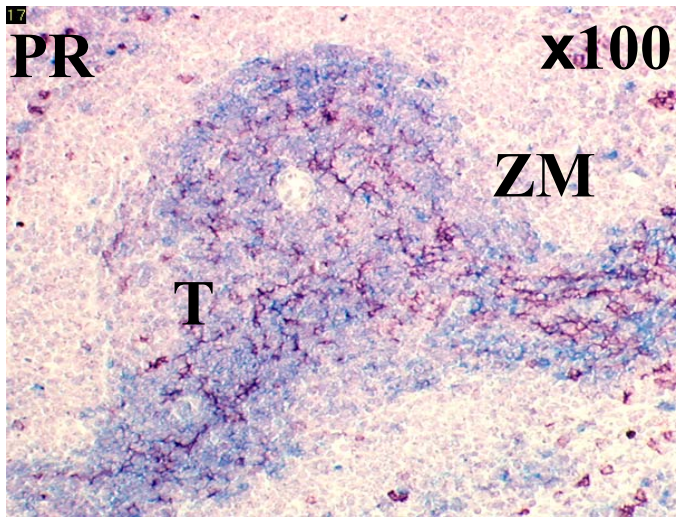
##### I.1.2. Marqueurs spécifiques au rat.

Chez le rat, le seul anticorps spécifique des DC actuellement disponible est l'OX62. Il a été réalisé par Brenan et al. par immunisation de souris avec des DC enrichies à partir de la lymphe efférente (M. Brenan and M. Puklavec, 1992). Cet anticorps reconnaît la chaîne  $\alpha$ E2 d'une intégrine (CD103) exprimée spécifiquement par les DC chez le rat et qui semble être similaire à l'intégrine  $\alpha$ E2 exprimée par les lymphocytes intra épithéliaux chez l'homme (M. Brenan and D.J. Rees, 1997). Bien que cet anticorps soit très spécifique des DC il ne

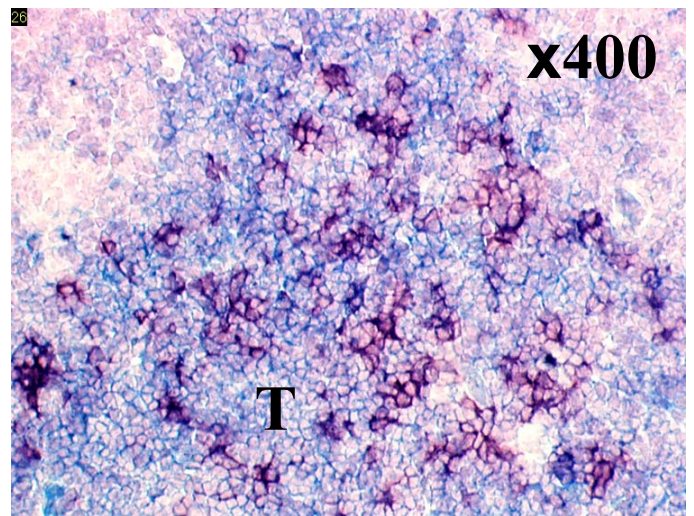
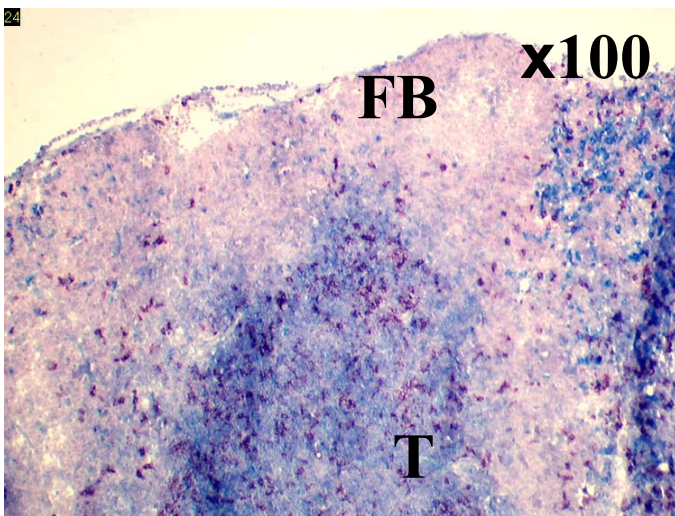
reconnaît néanmoins pas toutes les DC du rat. Les DC OX62<sup>+</sup> sont présentes dans tous les organes lymphoïdes et dans de nombreux organes non lymphoïdes, excepté dans les muscles lisses et le cœur (M. Brenan and M. Puklavec, 1992). En plus des DC, il a été également décrit que l'OX62 reconnaît, dans l'intestin grêle et la peau, les lymphocytes T $\gamma\delta$  (M. Brenan and M. Puklavec, 1992). Nous retrouvons également ces résultats dans les ganglions lymphatiques où 1% des cellules sont CD3<sup>+</sup> OX62<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> et OX42<sup>-</sup>. Toutefois, ces lymphocytes sont éliminés au cours du gradient de densité réalisé pour purifier les DC et ne contaminent donc pas les préparations de DC. Il faut également noter que le CD103 a été récemment décrit comme étant exprimé par les DC CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> chez la souris (A.D. McLellan, et al., 2002). Notre travail a porté sur l'identification des DC dans les organes lymphoïdes, notamment la rate. Nous avons dans un premier temps reproduit les travaux de Brenan et al. concernant la spécificité de l'anticorps OX62. Comme le montre la figure 1, dans la rate, les DC OX62 forment un réseau dense de cellules dans les zones T. Elles sont présentes en plus faible nombre dans la zone marginale où elles forment une couronne peu dense autour de la pulpe blanche. Dans la pulpe rouge on observe des DC OX62 réparties de manière dispersée. Les DC OX62 des ganglions sont essentiellement dans les zones T (paracortex) et en moins grande quantité dans la médullaire et les zones interfolliculaires. De plus, on observe que les DC présentes dans les zones T expriment plus fortement l'OX62 que les DC de la médullaire. Dans la rate et dans les ganglions, aucun marquage à l'OX62 n'est observé dans les zones B, ce qui indique que les GCDC (*Germinal Center Dendritic Cell*) sont CD103<sup>-</sup>.

L'anticorps OX62 reconnaît donc spécifiquement les DC chez le rat. L'absence de cellules T CD3<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> dans les cellules de basse densité ainsi que la spécificité des marquages observée dans la rate et les ganglions lymphatiques permettent d'envisager la purification des DC des organes lymphoïdes, avec cet anticorps.

## A. Rate



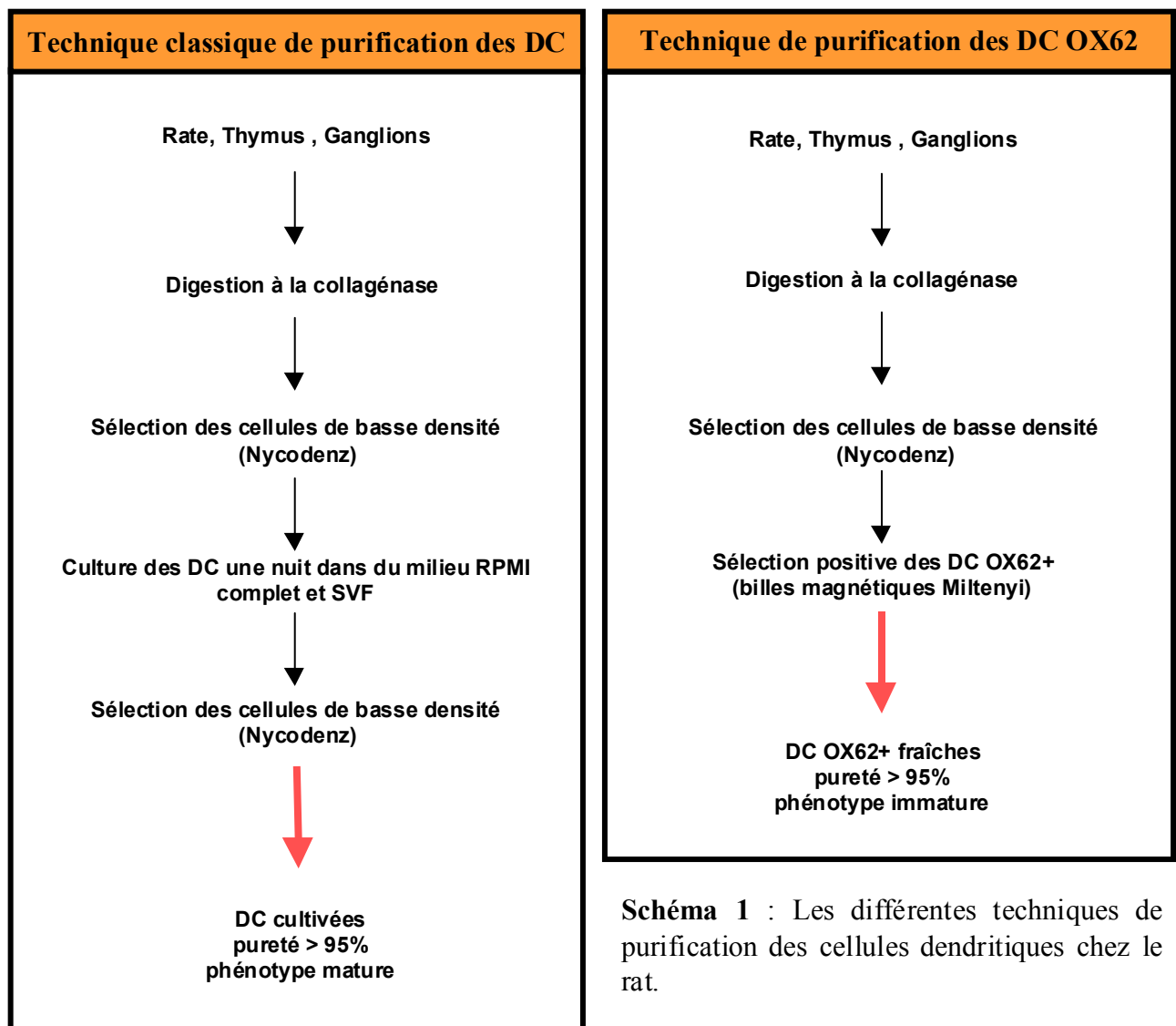
## B. Ganglions



**Figure 1** : Répartition du marquage à l'OX62 sur des coupes d'organes lymphoïdes. Des coupes de rate ou de ganglions lymphatiques mésentériques d'un animal naïf sont colorées par immunohistochimie avec l'anticorps OX62 révélé avec un anticorps anti souris couplé à la streptavidine peroxydase (pourpre) et l'anticorps anti CD4 biotinylé révélé avec une streptavidine phosphatase alcaline (bleu)

## I.2. Purification des cellules dendritiques chez le rat.

La technique que nous utilisons habituellement pour purifier les DC chez le rat est décrite dans le schéma 1. Elle comprend une étape de 12 heures de culture permettant l'élimination par adhérence d'une grande partie des macrophages et des cellules non leucocytaires. Cette technique permet d'obtenir des DC avec une pureté supérieure à 75% et il est nécessaire d'éliminer les lymphocytes B pour obtenir une pureté supérieure à 90%.



**Schéma 1** : Les différentes techniques de purification des cellules dendritiques chez le rat.

Cependant, l'étape de culture dont la signification physiologique n'est pas claire, entraîne une activation des DC qui se traduit par un changement de phénotype et de fonctions. Cette technique ne permet donc pas une étude physiologique des DC chez le rat. Les DC peuvent également être purifiées par sélection négative avec des marqueurs exprimés spécifiquement sur d'autres populations de leucocytes, cependant cette technique ne permet pas d'obtenir, chez le rat, une pureté supérieure à 50% et les cellules contaminantes sont essentiellement des cellules CD45<sup>-</sup> correspondant probablement à des cellules endothéliales et des fibroblastes. Nous avons donc mis au point une technique de purification des DC par sélection positive avec l'anticorps OX62 et des billes magnétiques (schéma 1) qui permet de pallier aux inconvénients des deux techniques précédentes. Les DC dites «fraîches» OX62<sup>+</sup> représentent respectivement 80%, 55% et 70% des cellules de basse densité exprimant fortement les molécules de CMH de classe II et non B, de la rate, des ganglions lymphatiques et du thymus. Les cellules OX62 négatives pourraient représenter soit une population particulière de DC, soit un stade différent de maturation ou de différenciation. Les DC purifiées par cette technique ont une pureté, basée sur l'expression du CMH II et de l'OX62, de plus de 90%. Les contaminants principaux sont des lymphocytes B et T, les macrophages et les NK ne représentant jamais plus de 2% des cellules. Elles ont un phénotype relativement immature cependant, comme on le verra, elles sont capables d'induire une stimulation de lymphocytes T allogéniques en culture leucocytaire mixte (II.1.1.Trinité et al. 2000) montrant ainsi que l'OX62 ne bloque pas la fonction présentatrice d'antigènes des DC.



## **II. Fonctions anti-tumorales des cellules dendritiques.**

### **II. 1. Activité cytolytique directe anti-tumorale des cellules dendritiques.**

#### **II.1.1. Article n°1 : Trinité at al. J.immunol 2000.**

## **A Subset of Cytolytic Dendritic Cells in Rat.**

**Benjamin Trinité, Cécile Voisine, Hideo Yagita, and Régis Josien.**

Les deux premiers auteurs ont contribué de manière équivalente à ce travail

Publié dans *The Journal of Immunology*, 2000, 165: 4202-4208

## Résumé de l'article n°1

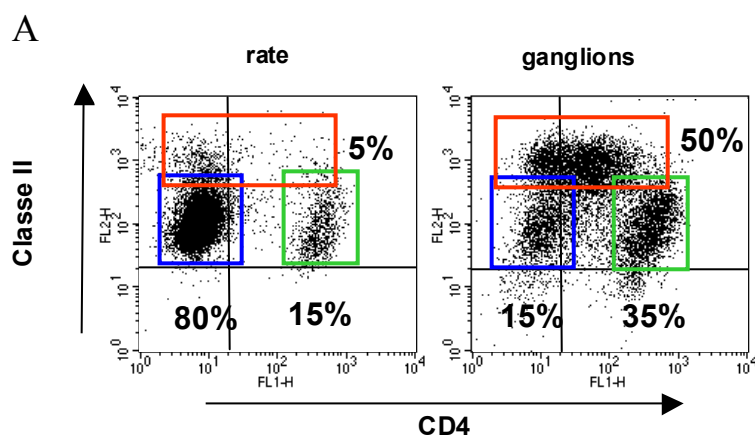
La fonction principale des DC est la présentation des antigènes aux lymphocytes T. Cependant, nous avons déjà montré que les DC issues de la rate, cultivées pendant une nuit, possédaient une activité cytotoxique contre les cellules YAC (R. Josien, et al., 1997). Dans cette étude, nous avons analysé cette fonction surprenante des DC, en utilisant des DC fraîchement extraites des organes lymphoïdes, avec l'anticorps OX62 et des billes magnétiques. Contrairement aux DC du thymus et des ganglions, les DC spléniques OX62 possèdent une activité cytotoxique contre des cellules tumorales YAC. L'analyse par FACS des DC OX62 des organes lymphoïdes montre qu'il existe plusieurs populations de DC définies par l'expression du marqueur CD4 et le CMH de classe II. Dans la rate, la population minoritaire (15%) est CD4<sup>+</sup> et coexprime les marqueurs CD5, SIRP $\alpha$  et CD90 tandis que la population majoritaire CD4<sup>-</sup> (80%), n'exprime pas les marqueurs CD5 et SIRP $\alpha$  et exprime faiblement la molécule CD90. On observe également une petite population de DC qui exprime fortement les molécules de classe II et faiblement le CD86. Ces populations de DC sont également retrouvées dans les ganglions mais dans des proportions différentes. Nous avons montré que l'activité cytotoxique des DC est restreinte à la population CD4<sup>-</sup>, qui est présente en plus faible proportion dans le thymus et les ganglions. De plus nous avons montré qu'à l'inverse des DC matures, cultivées une nuit, le mécanisme de cytotoxicité des DC OX62 était Ca<sup>2+</sup> indépendant. Il existe donc des mécanismes de lyse différents en fonction de l'état de maturation des DC. Il semble également que le mécanisme de cytotoxicité des DC OX62 ne fasse pas intervenir les molécules de la famille du TNF comme TRAIL, FasL et TNF $\alpha$ .

Il existe donc une sous-population de DC spléniques particulière qui possède une activité cytotoxique naturelle dont le mécanisme reste inconnu. Ces DC cytotoxiques pourraient donc jouer un rôle dans le lien entre l'immunité innée et l'immunité acquise.

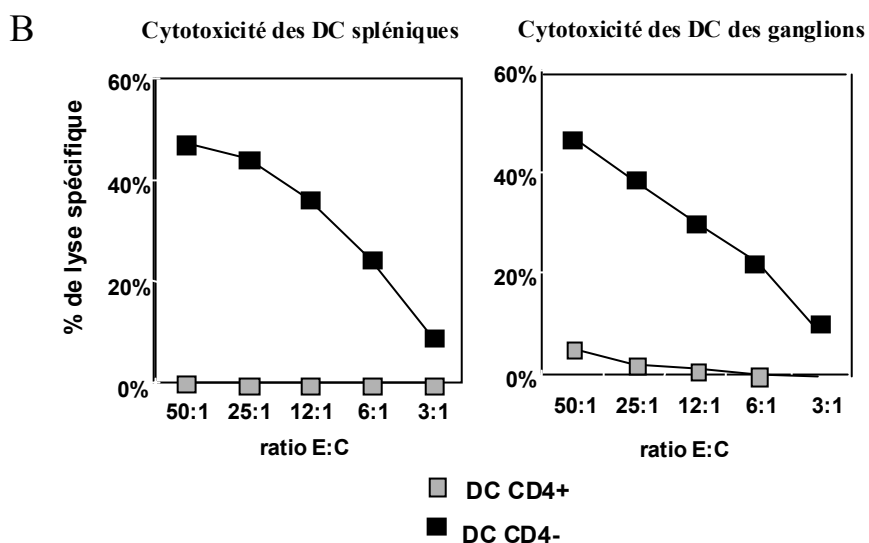
## II.1.2. Résultats additionnels et discussion.

### a. Identification d'une population de DC cytotoxiques dans les organes lymphoïdes.

Nous avons montré que l'activité cytotoxique des DC était exercée par une population particulière de DC OX62 fraîches. Cette population de DC cytotoxiques correspond à la population CD4<sup>-</sup> qui semble majoritaire dans la rate (figure 2A). Cependant, les populations de DC CD4<sup>+</sup> et CD4<sup>-</sup> sont également présentes dans les ganglions lymphatiques mais dans des proportions différentes (figure 2A). Nous avons donc testé l'activité cytotoxique des sous-populations de DC dans les ganglions (figure 2B). De la même manière que dans la rate, seules les DC CD4<sup>-</sup> des ganglions lymphatiques triées par FACS ont la capacité de tuer des cellules YAC-1.



**Figure 2:** Identification de la population cytotoxique dans les organes lymphoïdes. **A.** Les DC OX62<sup>+</sup> de la rate et des ganglions sont sélectionnées positivement comme décrit précédemment puis marquées avec les anticorps anti CD4 et anti classe II. La population CD4<sup>-</sup> est majoritaire dans la rate. **B.** Les DC OX62 CD4<sup>+</sup> et CD4<sup>-</sup> fraîchement extraites de la rate ou des ganglions sont triées par FACS et leur cytotoxicité est mesurée dans un test au <sup>51</sup>Cr contre des cellules tumorales YAC-1. Les DC sont mises en culture avec des cellules tumorales YAC.



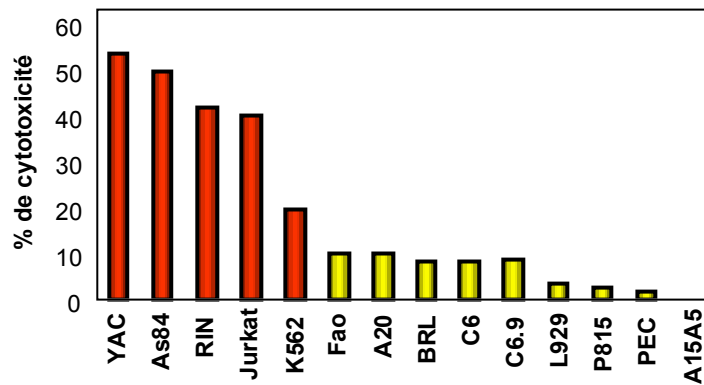
marquées au <sup>51</sup>Cr à différents ratio, dans du milieu complet avec SVF. Les plaques sont ensuite centrifugées et incubées à 37°C pendant 5 heures. Le pourcentage de lyse spécifique est déterminé dans les surnageants de culture par méthode de scintillation standard. Des résultats similaires ont été obtenus dans 5 expériences indépendantes pour la rate et dans 2 expériences indépendantes pour les ganglions.

Ceci montre que l'activité cytotoxique observée dans la rate n'est pas restreinte à cet organe, cependant elle est exercée uniquement par la population de DC CD4<sup>+</sup>, présente en majorité dans la rate et en minorité dans les ganglions.

Ces expériences montrent que la population CD4<sup>+</sup> retrouvée dans la rate et les ganglions possède le même phénotype et les mêmes fonctions dans ces deux organes. Ces cellules forment donc une population homogène dans les organes lymphoïdes et sont identiques aux DC CD4<sup>+</sup> SIRPα<sup>-</sup> décrites dans la lymphe efférente par le groupe de Mc Pherson (L. Liu, et al., 1998).

b. Lien entre la nature des cibles tumorales et la cytotoxicité des cellules dendritiques.

Nous avons montré que le mécanisme de cytotoxicité des DC ne faisait pas intervenir le système granzyme/perforine ni les molécules de la famille du TNF : TRAIL, FasL et TNFα. A l'heure actuelle ce mécanisme reste inconnu. Pour tenter d'élucider le mécanisme de cytotoxicité des DC nous nous sommes également intéressés aux cellules cibles tumorales. La cytotoxicité des DC OX62 a été testée contre un panel de cellules tumorales d'origines différentes (figure 3). On constate que les DC ne sont pas capables de tuer toutes les cellules tumorales. Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence un lien entre les cellules tuées ou non tuées. En effet, des cellules tumorales issues d'espèces différentes, de tissus différents et induites par des voies différentes (irradiation, chimique, spontanée), peuvent être tuées ou non par des DC OX62 spléniques. Les cellules cibles des DC n'ont donc pas de caractéristiques biologiques communes autres que leur sensibilité aux DC.



**Figure 3** : Nature des cibles tumorales et cytotoxicité des DC. Les DC OX62 fraîchement extraites de la rate ont été testées pour leur activité cytotoxique contre un panel de cellules tumorales différentes. Les tests de cytotoxicité sont réalisés au  $^{51}\text{Cr}$  comme décrit précédemment.

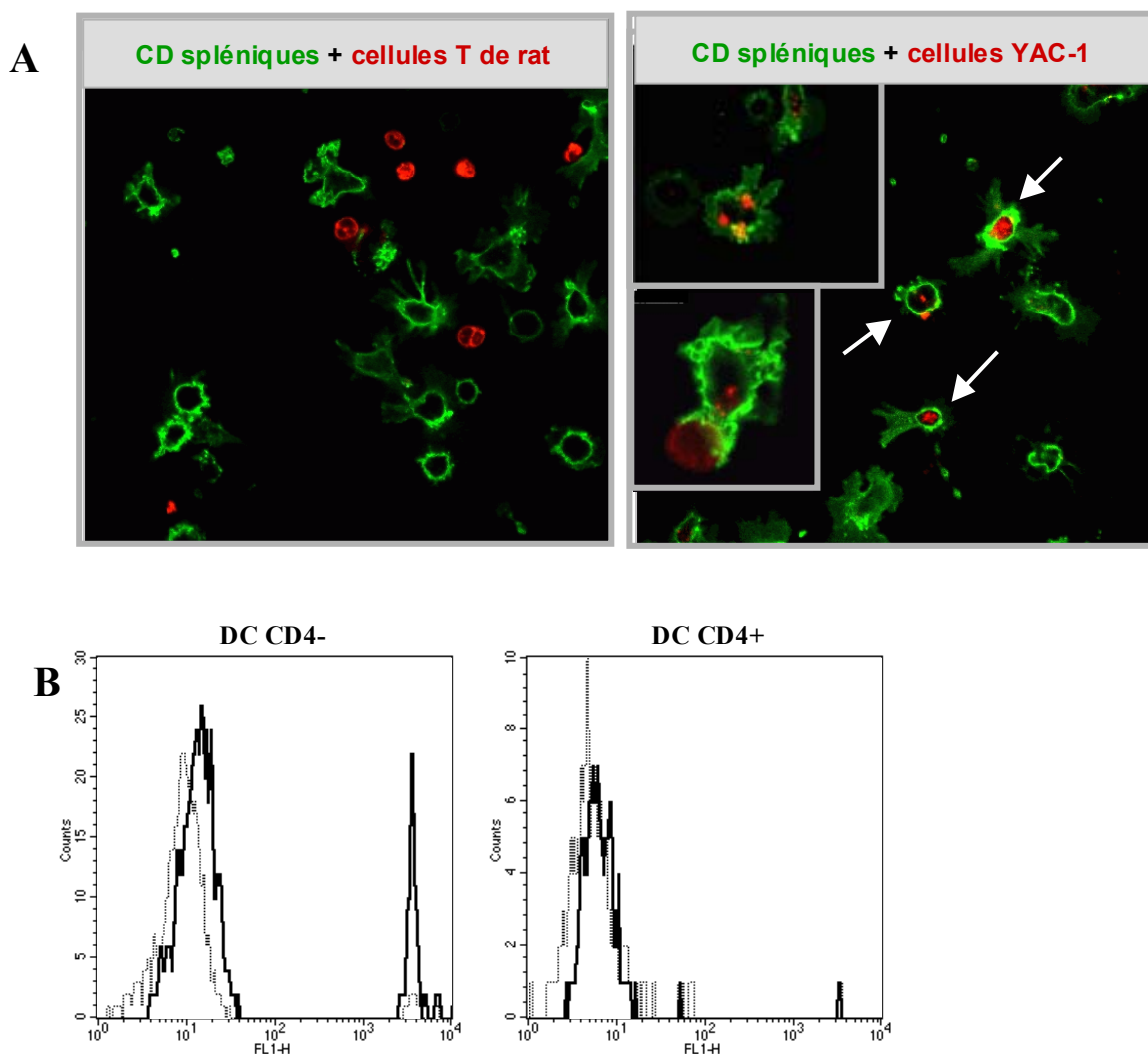
**YAC-1** (Lymphome T murin), **K562** (Leucémie myeloïde humaine), **RIN** (Insulinome de rat), **As84** (Adénocarcinome pancréatique de rat), **Jurkat** (Lymphome T humain)

c. Les cellules dendritiques cytotoxiques : lien entre l'immunité innée et acquise.

L'étude des cellules tumorales après la lyse par les DC montre que les cellules tumorales sont tuées par apoptose (résultats non montrés). Nous avons donc analysé la phagocytose de ces cellules apoptotiques par les DC. Des cellules YAC marquées de manière non spécifique par un fluorochrome sont mises en culture avec des DC OX62<sup>+</sup> pendant 5 heures à un ratio de 1:4. L'ensemble des cellules est ensuite récolté, les DC sont marquées avec un anticorps anti CMH de classe II, et sont observées par microscopie confocale. Comme le montre la figure 4A, de nombreux fragments de cellules YAC sont présents dans les DC et semblent contenus dans des vésicules dont il serait intéressant d'analyser la nature. Au contraire les lymphocytes T normaux de rat qui ne sont pas tués par les DC, ne sont pas retrouvés à l'intérieur des DC. Ceci suggère que les DC phagocytent leurs cibles après les avoir tuées. De plus, nous avons montré, avec des billes de latex FITC, que les DC CD4<sup>-</sup>

étaient de meilleures cellules phagocytaires que les DC CD4<sup>+</sup> (figure 4B). Il est donc possible que ce soit exclusivement les DC CD4<sup>-</sup> qui lysent et qui phagocytent leur cible.

L'activité cytotoxique des DC contre des cellules tumorales pourrait jouer un rôle important dans le lien entre l'immunité naturelle et l'immunité acquise notamment au cours de l'immunité anti-tumorale. En effet, les DC CD4<sup>-</sup> pourraient tuer des cellules tumorales *in vivo*, les phagocyter puis présenter des antigènes tumoraux aux lymphocytes T.



**Figure 4:** A. Phagocytose des cellules cibles par les DC. Les DC OX62 sont extraites de la rate et mises en culture avec des cellules YAC ou des lymphocytes T marqués au PKH26 (rouge), à un ratio de 4:1. Après 5 heures de culture, les cellules sont récoltées, sont mises à adhérer sur des lames de verre recouvertes de bleu d'alcan et les DC sont marquées avec un anti CMH de classe II FITC. La phagocytose est analysée par microscopie confocale. B. Capacité de phagocytose des DC. Les DC fraîchement extraites de la rate sont mises en culture dans du milieu RPMI complet, avec des billes de latex couplées au FITC. La phagocytose des DC est ensuite évaluée par FACS après 1 heure de culture. Des résultats similaires ont été obtenus dans 2 expériences indépendantes.

Dans ce travail, nous avons donc caractérisé plusieurs sous-populations de DC dans les organes lymphoïdes secondaires chez le rat. La population de DC CD4<sup>-</sup>, de la rate et des ganglions, possède une activité cytotoxique naturelle contre des cellules tumorales *in vitro*. Cette activité originale pour des DC n'en reste pas moins intéressante. Cette activité, si elle existe *in vivo*, pourrait être impliquée dans différentes fonctions des DC CD4<sup>-</sup>. En effet il a été décrit, chez le rat, deux populations de DC CD4<sup>+</sup> SIRPα<sup>+</sup> et CD4<sup>-</sup> SIRPα<sup>-</sup> dans la lymphe efférente intestinale qui possèdent un phénotype et des fonctions similaires aux sous-populations de DC spléniques CD4<sup>+</sup> et CD4<sup>-</sup> (L. Liu, et al., 1998). De plus, les DC CD4<sup>-</sup> de la lymphe transportent des corps apoptotiques de cellules épithéliales intestinales vers les ganglions. Ces cellules jouent vraisemblablement un rôle dans la tolérance périphérique au soi (F.P. Huang, et al., 2000). La cytotoxicité des DC CD4<sup>-</sup> de la rate pourrait donc faire partie d'un des mécanismes par lequel les DC acquièrent les antigènes du soi et il serait intéressant de mesurer l'activité cytotoxique des DC issues de la lymphe intestinale. De plus, les DC CD4<sup>-</sup> de la rate et de la lymphe stimulent moins efficacement les lymphocytes T que les DC CD4<sup>+</sup>. Ces résultats suggèrent fortement que la population de DC CD4<sup>-</sup> en l'absence de signaux de danger permet le maintien de la tolérance au soi.

L'activité cytotoxique des DC pourrait également jouer un rôle dans l'immunité anti-tumorale. En effet les tumeurs infiltrées par les DC ont un pronostic plus favorable (Y. Becker, et al 1993) et il est possible que les DC CD4<sup>-</sup> tuent, phagocytent les cellules tumorales et présentent les antigènes tumoraux aux cellules T. Cependant, ces cellules pourraient également être responsables de l'absence de réponse immunitaire contre la tumeur en tolérant les cellules T spécifiques des antigènes tumoraux.

Dans le but de comprendre le rôle potentiel de cette fonction cytotoxique des DC au cours de l'immunité anti-tumorale *in vivo*, nous avons réalisé une collaboration avec le Dr Marc Grégoire dans l'unité INSERM 419.



## **II.2. Cellules dendritiques et phagocytose : article n°2 Masse et al. 2002.**

La collaboration avec une équipe spécialisée dans l'immunothérapie cancéreuse avait pour but à la fois la caractérisation des cellules impliquées dans la réponse immunitaire contre une tumeur colique (cellules PROb) dans un protocole de vaccination, avec des cellules PROb apoptotiques et de l'IL-2 (Masse et al. 2002), et la mise en place d'un modèle chez le rat permettant l'évaluation de l'effet anti-tumoral des DC OX62 cytotoxiques. Cette dernière partie n'a pas pu être réalisée pour des raisons techniques.

**Increased Vaccination Efficiency with Apoptotic Cells by  
Silica-induced, Dendritic-like Cells.**

**Delphine Massé, Cécile Voisine, Frédéric Henry, Sandrine Cordel,  
Isabelle Barbieux, Régis Josien, Khaled Meflah, Marc Grégoire, and  
Blandine Lieubeau.**

Publié dans *Cancer Research*, 2002, 62: 1050-1056

## Résumé de l'article n°2

Il a déjà été montré par l'équipe du Dr M. Grégoire, l'efficacité des cellules apoptotiques à induire une réponse immune dans un protocole de vaccination avec des cellules apoptotiques et de l'IL-2 dans un modèle de tumeur colique léthale chez le rat. Le protocole d'immunisation entraîne la survie de 33% des animaux traités. Afin de déterminer les rôles des cellules phagocytaires (cellules dendritiques et macrophages) au cours de ce traitement, l'environnement de la cavité péritonéale a été modulé par injection préalablement aux cellules apoptotiques et à l'IL-2, de silice ou de thioglycollate. Nous avons montré que le thioglycollate supprime l'effet protecteur de la vaccination initiale. En effet, bien qu'il y ait un recrutement massif de macrophages inflammatoires capables de phagocyter les cellules apoptotiques, ceux-ci n'entraînent pas de réponse immune spécifique contre la tumeur. Au contraire, la silice augmente la survie des rats traités de 33% à 66%. De plus, on observe dans la cavité péritonéale, des cellules au phénotype de DC (CMH de classe II<sup>+</sup>, B7.2<sup>+</sup>) capables de phagocyter les corps apoptotiques tumoraux *in vivo*. Contrairement aux cellules issues des animaux traités au thioglycollate, ces cellules entraînent une réponse proliférative de cellules T allogéniques *in vitro*.

Ces résultats montrent que l'immunogénicité des cellules apoptotiques dépend essentiellement de la nature des cellules phagocytaires. Celles-ci ont donc leur importance dans le choix de la stratégie de vaccination anti-tumorale.

### II.2.1. Discussion.

Ces résultats suggèrent la capacité des cellules apoptotiques à induire une réponse immunitaire *in vivo*. Cette capacité est toutefois dépendante de la nature des cellules phagocytaires et un traitement avec de la silice, qui inhibe partiellement la fonction macrophagique, semble permettre une présentation efficace des antigènes tumoraux par une population de DC. L'origine des DC recrutées par le traitement à la silice reste à déterminer. En effet, la population de DC CD4<sup>-</sup> cytotoxique est présente dans des tissus comme l'intestin (F.P. Huang, et al., 2000) et pourrait donc être celle recrutée dans la cavité péritonéale. Cependant les PEC classe II<sup>+</sup> issues des animaux traités à la silice sont négatives pour l'OX62, expriment toutes l'OX41 (SIRP $\alpha$ ) et sont hétérogènes pour la molécule CD4 (Résultats non montrés). Elles sont donc différentes des DC CD4<sup>-</sup> décrites dans la rate et la lymphe efférente. Bien que le phénotype de ces cellules ne soit pas encore complet, il semble similaire à celui des cellules de Langerhans qui chez le rat expriment le SIRP $\alpha$  mais pas la molécule CD4 (M.Heslan et R Josien résultats non publiés) (A.P. Robinson, et al., 1986). De plus, ces DC expriment le NKRP-1 mais ne sont pas cytotoxiques contre les cellules tumorales YAC-1 ce qui est également observé dans les DC CD4<sup>+</sup> de la rate qui expriment des quantités relativement plus importantes de NKRP-1 que les DC CD4<sup>-</sup>. Toutefois, l'activité cytotoxique des PEC vis à vis des cellules Prob reste à être déterminée. Enfin il a été montré chez la souris que les monocytes pouvaient se différencier *in vivo* en DC CD8<sup>-</sup> qui migrent dans les ganglions après un stimulus puissant de phagocytose (G.J. Randolph, et al., 1999). Les monocytes étant abondants dans la cavité péritonéale les DC recrutées après le traitement à la silice pourraient en fait se différencier *in situ* à partir des monocytes après avoir phagocyté la silice et/ou les corps apoptotiques tumoraux. L'étude des DC dans les organes lymphoïdes drainant la cavité péritonéale semble donc également nécessaire afin de déterminer les populations de DC mis en jeu et les réponses des lymphocytes T induites par ce type de traitement.

### **III. Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des sous-populations de cellules dendritiques spléniques.**

#### **III.1. Caractérisation des sous-populations de cellules dendritiques spléniques OX62<sup>+</sup>**

Nous avons mis en évidence l'existence chez le rat de sous-populations de DC CD4<sup>+</sup> et CD4<sup>-</sup> dans les organes lymphoïdes. De plus, les DC CD4<sup>-</sup> spléniques et des ganglions possèdent une activité cytotoxique contre des cellules tumorales. Ceci suggère que ces deux populations de DC possèdent un phénotype et des fonctions différentes, comme il a été déjà montré pour les sous-populations de DC chez la souris et chez l'homme ((R. Maldonado-Lopez, et al., 1999), (M.C. Rissoan, et al., 1999)). Nous nous sommes donc intéressés aux caractéristiques biologiques et aux fonctions plus classiques des DC CD4<sup>+</sup> et CD4<sup>-</sup>. Les cellules OX62 de la rate étant plus faciles à obtenir en quantité importante, nous avons étudié plus particulièrement les populations de DC dans cet organe.

III.1.1. Article n°3 : Voisine et al. 2002.

**Two Phenotypically Distinct Subsets of Spleen Dendritic Cells in  
Rats Exhibit Different Cytokine Production and T Cell  
Stimulatory Activity.**

**Cécile Voisine, François-Xavier Hubert, Benjamin Trinité, Michèle Heslan,  
and Régis Josien**

**Publié dans *The Journal of Immunology*, 2002, 169: 2284-2291**

### Résumé de l'article n°3

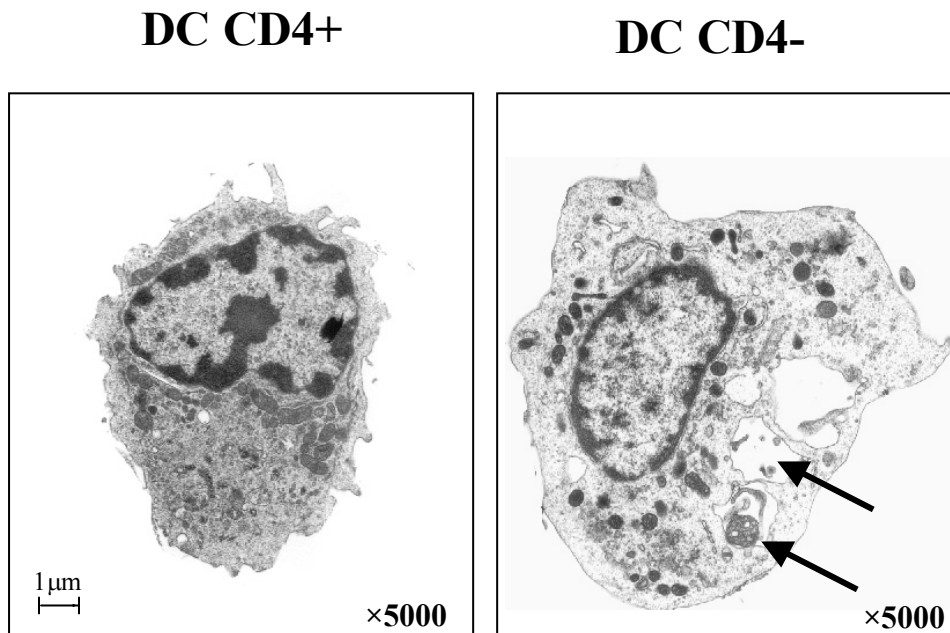
Nous avons montré précédemment que l'expression du marqueur CD4 sur les DC définissait deux sous-populations de DC spléniques et que la sous-population de DC CD4<sup>-</sup> possédait une activité cytotoxique contre des cellules tumorales. Chez le rat il a été récemment montré qu'une population de DC CD4<sup>-</sup> de la lymphe intestinale, semblable à celle observée dans la rate, pourrait avoir un rôle dans la tolérance au soi *in vivo*. Dans cette étude nous avons analysé le phénotype et les fonctions, en particulier au cours de l'activation des cellules T, des sous-populations de DC spléniques fraîchement extraites. Contrairement aux DC CD4<sup>-</sup>, les DC CD4<sup>+</sup> coexpriment les marqueurs CD5, SIRP $\alpha$  et CD90. Les deux populations de DC ont un phénotype relativement immature malgré une faible expression constitutive de la molécule CD80. Contrairement aux CD4<sup>+</sup>, la demi-vie des DC CD4<sup>-</sup> est très courte *in vivo* mais peut être augmentée par la ligation du CD40, l'IL-3, ou le GMCSF. La population CD4<sup>-</sup> produit des quantités importantes de cytokines proinflammatoires comme l'IL-12 et le TNF $\alpha$  et induit une réponse T helper de type Th1, tandis que les DC CD4<sup>+</sup> produisent très peu d'IL-12 et pas de TNF $\alpha$  et induisent une réponse TCD4 de type Th1/Th0. Les DC CD4<sup>+</sup> induisent également une prolifération importante des lymphocytes T CD8 tandis que les DC CD4<sup>-</sup> sont de faibles stimulatrices de ces cellules. Après stimulation par le CD40L, les DC CD4<sup>-</sup> augmentent cependant leur capacité de stimulation des lymphocytes T CD8.

Comme chez l'homme et la souris, nous avons montré chez le rat l'existence d'une population de DC spécialisée dans la production de l'IL-12 induisant une réponse TCD4 de type Th1. L'absence de production d'IFN $\alpha$  par les deux sous-populations de DC, après une stimulation virale, suggère qu'elles ne correspondent pas aux DC plasmacytoïdes.

### III.1.2. Résultats additionnels et discussion.

#### a. Morphologie des sous-populations de cellules dendritiques OX62 spléniques

Afin de mieux caractériser chaque population de DC  $CD4^+$  et  $CD4^-$ , nous avons analysé leur morphologie en microscopie électronique. Cette analyse confirme en tout point les résultats de la microscopie optique. Les DC  $CD4^+$  sont des cellules assez hétérogènes qui sont plus petites que les DC  $CD4^-$ . Elles ont un fort rapport nucléoplasmique et peuvent posséder quelques dendrites. En revanche, les DC  $CD4^-$  sont de grosses cellules qui contiennent de nombreuses granules intracytoplasmiques et qui ont une morphologie typiquement myéloïde. De plus, ces cellules contiennent de larges phagosomes contenant parfois du matériel hétérogène (flèches). Bien que ces populations de DC aient des phénotypes relativement homogènes, on observe cependant une hétérogénéité morphologique dans les deux sous-populations de DC qui est cependant plus marquée dans les DC  $CD4^+$

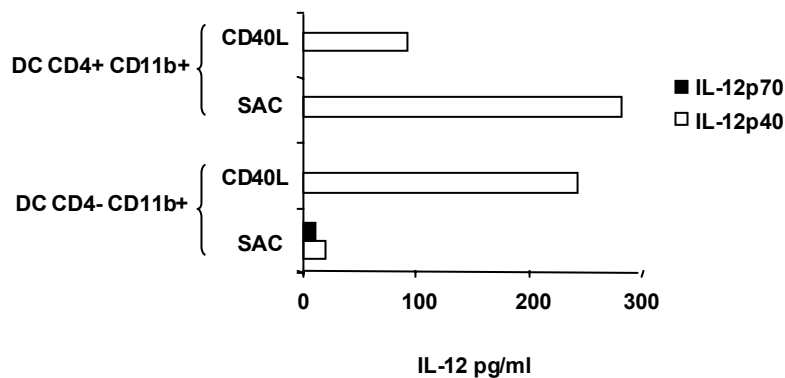


**Figure 5:** Les sous-populations de DC OX62  $CD4^+$  et  $CD4^-$  ont été triées par FACS comme décrit précédemment puis analysées en microscopie électronique. (G. Pradal, centre régionale de microscopie électronique et de micro-analyse de l'ensemble santé, Faculté de Médecine, Université de Nantes).



b. Production d'IL-12p70 par les sous-populations de cellules dendritiques OX62 spléniques.

Nous avons montré, par PCR quantitative en temps réel, que l'IL-12p70 n'est probablement produite que par les DC CD4<sup>+</sup>. Nous avons pu vérifier ces résultats par un test ELISA récemment mis sur le marché. On observe que les DC CD4<sup>+</sup> produisent de l'IL-12p40 mais pas d'IL-12p70 après stimulation par le CD40L ou le SAC, ce qui confirme les résultats obtenus par PCR (figure 6). Au contraire, les DC CD4<sup>-</sup> produisent de l'IL-12p40 et de l'IL-12p70 après stimulation avec le SAC. Le CD40L n'induit pas la production d'IL-12p70 par les DC CD4<sup>-</sup> ce qui est discordant avec les résultats obtenus par PCR. Il faut néanmoins signaler la grande variabilité de production d'IL-12p40 par les DC CD4<sup>-</sup> après stimulation par le CD40L. Ces résultats d'ELISA doivent donc être reproduits. L'ensemble de ces résultats suggère que la population de DC CD4<sup>-</sup> est spécialisée dans la production de l'IL-12 bioactive.

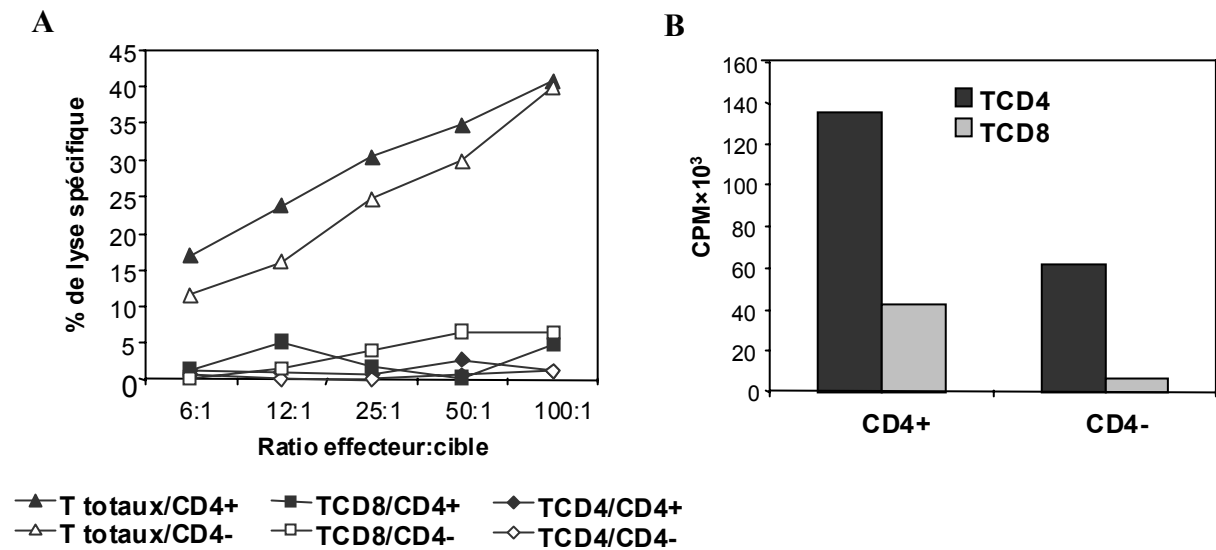


**Figure 6** : Les DC CD4<sup>+</sup> et CD4<sup>-</sup> ont été triées par FACS puis mis en culture à raison de  $2.5 \times 10^4$  cellules par puits dans du milieu RPMI complet avec 10% de SVF en présence des différents stimuli (CD40L : surageant dilué au 1/300; SAC: 20  $\mu$ g/ml). A 24 heures les surageants de culture sont prélevés puis l'IL-12p40 et l'IL-12p70 sont mesurées par ELISA.

c. Différenciation de lymphocytes T cytotoxiques *in vitro* par les sous-populations de cellules dendritiques OX62 spléniques.

Il a déjà été montré que les DC CD8<sup>+</sup> et CD8<sup>-</sup> chez la souris étaient capables d'induire des lymphocytes T cytotoxiques *in vivo*, et ce même en l'absence des lymphocytes T CD4 (G. Schlecht, et al., 2001). Nos résultats montrent que les DC CD4<sup>-</sup> stimulent très faiblement les

cellules T CD8 naïves (Voisine et al. et figure 7 B). Nous avons testé la capacité des deux sous-populations de DC spléniques à induire une différenciation de lymphocytes T CD8 cytotoxiques mais aussi des lymphocytes T CD4 *in vitro* (figure 7 A). Les sous-populations de DC triées sont cultivées avec des lymphocytes T CD4, T CD8 ou T totaux allogéniques pendant cinq jours. Les lymphocytes sont ensuite récoltés, comptés et mis au repos pendant 48h en présence d'une faible quantité d'IL-2. Enfin, leur activité cytotoxique est mesurée par un test de cytotoxicité contre des cellules ganglionnaires blastiques de la même souche que les DC. Les résultats illustrés dans la figure 7 A montrent que les sous-populations de DC n'induisent pas la différenciation de lymphocytes T cytotoxiques à partir de cellules T CD8 ou de cellules T CD4 purifiées. Au contraire, on observe une forte activité cytotoxique dans les lymphocytes T totaux, et ceci avec les deux sous-populations de DC.



**Figure 7 :** Induction de lymphocytes T cytotoxiques par les DC OX62+. Les DC OX62+ triées par FACS sont mises en culture avec des lymphocytes T allogéniques à un ratio de 1 :5, dans du milieu RPMI complet avec 10% de SVF. Après 4 jours la prolifération des lymphocytes T est mesurée par incorporation de thymidine tritiée (B). Après 5 jours de culture, les lymphocytes T sont récoltés et sont mis au repos ( $3 \times 10^5$ /ml) en présence d'IL2 (25U/ml) pendant 48 heures. Leur capacité cytotoxique est ensuite analysée dans un test de cytotoxicité au  $^{51}\text{Cr}$  contre des cellules ganglionnaires blastiques induites par la ConA du même CMH que les CD stimulatrices ou de CMH contrôle (A). Ces résultats préliminaires n'ont été réalisés qu'une fois dans ces conditions.

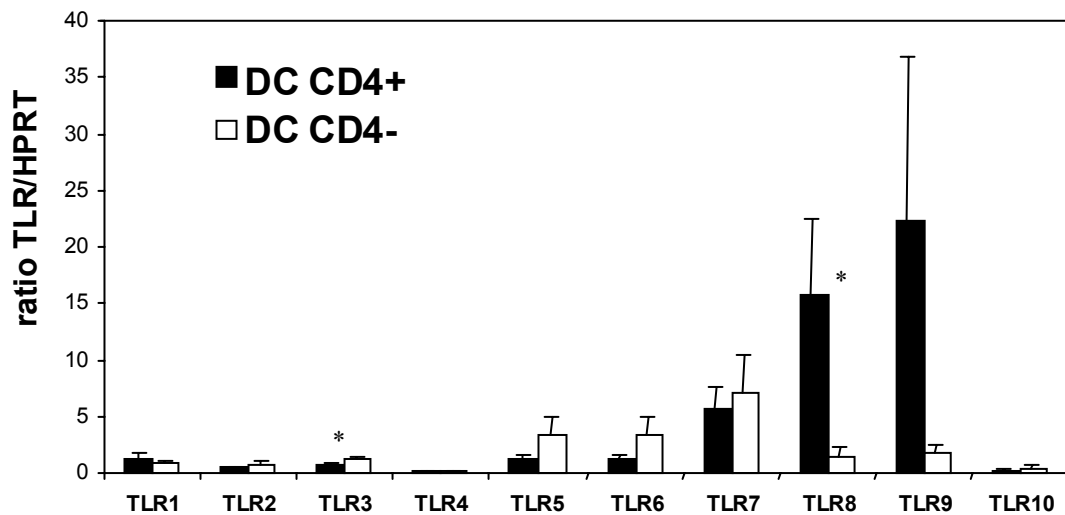
Il semble donc que les DC OX62 dans ces conditions soient capables d'induire des cellules T cytotoxiques spécifiques de leur CMH. Contrairement à ce qui a été observé chez la

souris il semble que la présence de lymphocytes T CD4 soit nécessaire pour l'induction de CTL quelque soit la sous-population de DC utilisée. Il serait cependant intéressant de tester si les DC OX62 sont capables d'induire des cellules T cytotoxiques *in vivo* en condition syngénique d'une part, et d'autre part après avoir été chargées avec une protéine ou des cellules apoptotiques ou après stimulation avec le CD40L. Ainsi on pourrait évaluer la capacité des DC à réaliser une présentation croisée. En effet, chez la souris les DC CD8<sup>+</sup>, qui possèdent des caractéristiques communes avec les DC CD4<sup>-</sup>, comme on le verra, sont des DC spécialisées dans la présentation croisée des antigènes et en particulier des antigènes issus des cellules mortes. De plus les DC CD4<sup>-</sup> tuent et phagocytent des cellules tumorales et pourraient induire des CTL spécifiques des antigènes tumoraux. Paradoxalement, ces cellules, *in vitro*, induisent une très faible stimulation et différenciation des cellules T CD8 purifiées même en présence de CD40L. L'induction de CTL par les DC CD4<sup>-</sup> semble donc strictement dépendante de la présence des cellules T CD4 qui peut alors agir sur les DC par le signal CD40L et sur les cellules T CD8 via la production d'IL-2.

#### d. Expression des TLR par les sous-populations de DC OX62 spléniques.

La production de cytokines par les DC indique que chaque population de DC est sensible à des stimuli différents et répond de manière différente. Nous nous sommes donc intéressés à l'expression des TLR (*Toll Like Receptors*) par les sous-populations de DC. En effet les TLR sont les récepteurs des PAMPs (*Pathogen associated molecular pattern*) qui permettent aux DC de discriminer un très grand nombre de pathogènes et de s'activer en conséquence. L'expression des dix TLR connus a donc été dosée par RT-PCR quantitative en temps réel à partir d'ARNm des DC fraîchement extraites. Comme le montre la figure 8, les deux populations de DC OX62 expriment en quantité variable les TLR 1 à 10. Elles expriment en très faible quantité les TLR 1, 2, 3, 4 et 10 et en plus forte quantité les TLR 5 à

9. Les DC CD4<sup>-</sup> expriment significativement plus de TLR3 (récepteur de l'ARN double brin viral) que les DC CD4<sup>+</sup>. Ceci montre que les deux populations de DC peuvent posséder le même TLR mais répondre de manière différente à sa ligation. En effet, seules les DC CD4<sup>-</sup> produisent du TNF $\alpha$  en réponse au poly(I:C), ligand du TLR3 (figure 6 Voisine et al. 2002). D'autre part, les CD4<sup>-</sup> expriment très faiblement le TLR4, récepteur du LPS, bien qu'elles soient sensibles à ce stimulus. Cependant, il a été montré que le TLR4 n'est pas le seul récepteur du LPS. Il est en fait reconnu par un complexe de protéine comprenant la LBP, le MD2 et le CD14 (Q. Jiang, et al., 2000). Les DC CD4<sup>+</sup> possèdent de grandes quantités d'ARNm des TLR 8 (ligand naturel inconnu) et du TLR9 (récepteur des ODN aux motifs CpG) comparé aux DC CD4<sup>-</sup>. Le TLR9 est exprimé de manière beaucoup plus importante dans les CD4<sup>+</sup> que dans les DC CD4<sup>-</sup> bien que la différence ne soit pas statistiquement significative probablement en raison du nombre limité d'échantillon (n=3). L'expression du TLR7 et du TLR8 suggère que les DC OX62 pourraient être sensibles à des composés ou des produits viraux comme le montrent les premières études sur les ligands de ces TLR (M. Jurk, et al., 2002). Les DC CD4<sup>+</sup> et CD4<sup>-</sup> expriment donc tous les TLR mais dans des quantités différentes. Ces résultats associés à la production de cytokines par ces cellules suggèrent que chaque population de DC possède un répertoire de reconnaissance des pathogènes différent. De plus, il est possible qu'elles puissent moduler l'expression des TLR au cours de leur maturation (A. Visintin, et al., 2001). Enfin, il serait intéressant d'analyser la production de cytokines par les sous-populations de DC après stimulation avec les ligands des TLR 1-2 et 2-6 qui n'ont pas du tout été testé dans cette étude. De plus, il a été montré que le CD40L avait un effet synergique avec la stimulation par les TLR sur la quantité de cytokines produite par les DC chez la souris (A.D. Edwards, et al., 2002) et l'ajout d'un signal T avec la stimulation par les TLR pourrait être intéressant.



**Figure 8:** Expression des TLR par les sous-populations de DC de la rate. L'ARNm de chaque sous population de DC triées par FACS a été dosé pour l'expression des TLR 1 à 10 par PCR quantitative en temps réel. Les résultats sont exprimés en ratio du nombre de copies du TLR sur le nombre de copies de l'HPRT (gène de référence). Les déviations standards représentent les variations entre trois tris de cellules différents

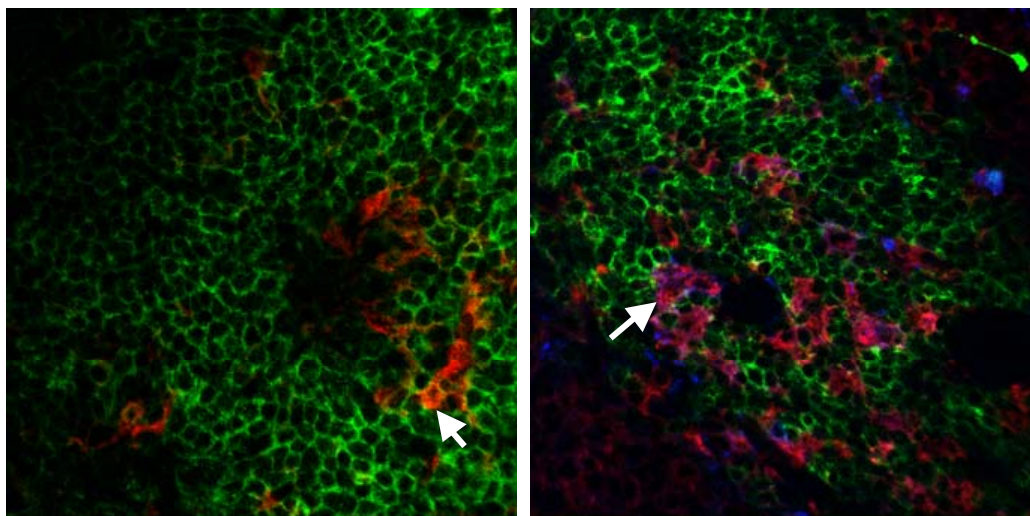
L'expression des TLR a également été mesurée par PCR quantitative dans les lymphocytes T CD4 totaux et les monocytes. Les monocytes expriment une grande variété de TLR comme déjà montré chez l'homme (K.A. Zarembek and P.J. Godowski, 2002) tandis que les cellules T CD4 n'expriment aucun TLR. Ces résultats sont en contradiction avec ce qui a récemment été décrit sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> régulateurs chez la souris. En effet il a été montré que ces lymphocytes exprimaient des quantités importantes de TLR4 (I. Caramalho, et al., 2003). Ces résultats ont été obtenus par PCR classique sur gel d'agarose et bien que les T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> soient présents dans les T CD4<sup>+</sup> totaux, nous n'avons pas observé d'expression de TLR4 par PCR quantitative en temps réel.

e. Fonctions des sous-populations des cellules dendritiques splénique *in vivo*.

• **Localisation des cellules dendritiques OX62 dans la rate.**

Afin de déterminer la localisation de chaque sous-population dans la rate nous avons réalisé des triples marquages pour la microscopie confocale avec les anticorps anti CD4, anti CMH de classe II et OX62 (figure 9). La mauvaise qualité et la faible intensité du marquage

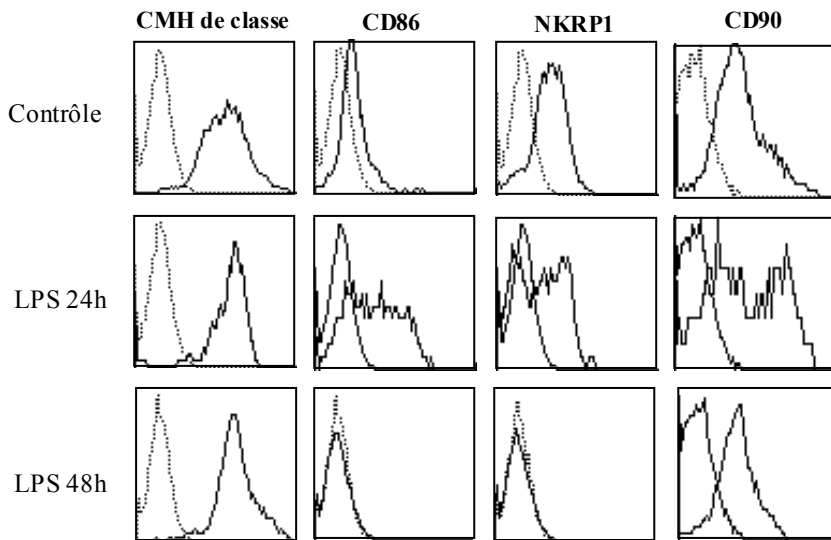
immunofluorescent avec l'OX62 dans ces conditions ne permet pas de visualiser toutes les DC dans la rate et encore moins les DC CD4<sup>+</sup> qui expriment plus faiblement cet antigène. Ceci explique l'absence de cellules triplement marquées et ne nous permet pas de localiser précisément chaque population. Cependant, on observe dans les zones T des cellules doublement marquées CMH de classe II et CD4 qui correspondraient à la population CD4<sup>+</sup> et des cellules CMH de classe II et OX62 qui correspondraient à la population CD4<sup>-</sup>. Le marquage OX62 dans la pulpe rouge est très faible et très rare contrairement à ce qui a été montré par immunohistochimie (cf figure1). Ces résultats sont donc difficilement interprétables et ne sont pas en accord avec ceux déjà obtenus. En effet, il a déjà été montré dans la rate que les DC CD4<sup>+</sup> étaient localisées autour de la zone T tandis que les DC CD4<sup>-</sup> sont présentes dans la zone T et la pulpe rouge (E. Turnbull and G. MacPherson, 2001).



**Figure 9** : Localisation des sous-populations de DC dans la rate. Des coupes de rate d'animaux naïfs préalablement saturées au PBS lait 3% sont triplement marquées avec les anticorps anti CD4 couplé au FITC (vert), anti CMH de classe II biotinylé révélé à la streptavidine Alexa 568 (rouge) et OX62 révélé avec un anti-Ig de souris couplé à l'Alexa 633 (bleu) Les lames sont ensuite fixées au paraformaldéhyde à 4% pendant 15 min puis montées à l'aide du prolong life kit. Le triple marquage a été ensuite analysé par microscopie confocale en lecture séquentielle. Les DC CD4<sup>+</sup> doivent être triple marquées et apparaître en blanc et les DC CD4<sup>-</sup> double marquées en violet. La flèche dans le cadran de gauche montre une cellule doublement marquée CD4 et classe II tandis que la flèche du cadran droit montre une cellule doublement marquée classe II et OX62.

- **Maturation *in vivo* des cellules dendritiques spléniques.**

Nous avons montré que, pendant la maturation, les DC OX62 augmentaient l'expression de la molécule CD90 (Thy1.1) (figure 2, C. Voisine, et al., 2002). Cette expression du CD90 au cours de la maturation est plus importante dans les CD4<sup>-</sup> qui expriment plus faiblement cet antigène à l'état immature. Des résultats antérieurs montrent que le LPS entraîne une néo-expression du CD90 sur des DC OX62 Thy<sup>-</sup> triées par FACS, et ce de manière dépendante de la dose de LPS (résultats non montrés). Nous avons également montré que l'injection de LPS à des rats entraîne la maturation des DC. Cette maturation se traduit, 24 heures après l'injection, par l'augmentation du CMH de classe II et de la molécule CD86 mais également par l'augmentation de la molécule CD90 (figure 10). Quarante huit heures après l'injection, on n'observe plus d'expression de CD90, ni de CD86. Ces résultats suggèrent que la molécule CD90 est associée à un phénotype de DC matures et que les DC CD90<sup>+</sup> meurent après maturation comme déjà décrit chez la souris (T. De Smedt, et al., 1996). Les DC CD4<sup>+</sup> CD90<sup>+</sup> ont un phénotype plus mature et une meilleure capacité de stimulation des cellules T que les DC CD4<sup>-</sup> CD90<sup>-</sup> (C. Voisine, et al., 2002), ce qui corrèle également avec ces résultats. Il serait donc envisageable que les DC CD4<sup>+</sup> et CD4<sup>-</sup> représentent des stades de maturation différents d'une même population. Cependant, nous n'avons jamais observé l'expression de la molécule CD4 par les DC CD4<sup>-</sup> au cours de la maturation *in vitro*. Toutefois, au cours de la maturation des DC CD4<sup>+</sup> *in vitro* on observe, entre trois et quatre jours de culture, l'apparition d'une population de DC CD4<sup>-</sup> qui exprime très faiblement les molécules de CMH de classe II (résultats non montrés). Ceci suggère en fait que la population de DC CD4<sup>+</sup> n'est pas homogène et qu'elle pourrait contenir des précurseurs de DC CD4<sup>-</sup>.



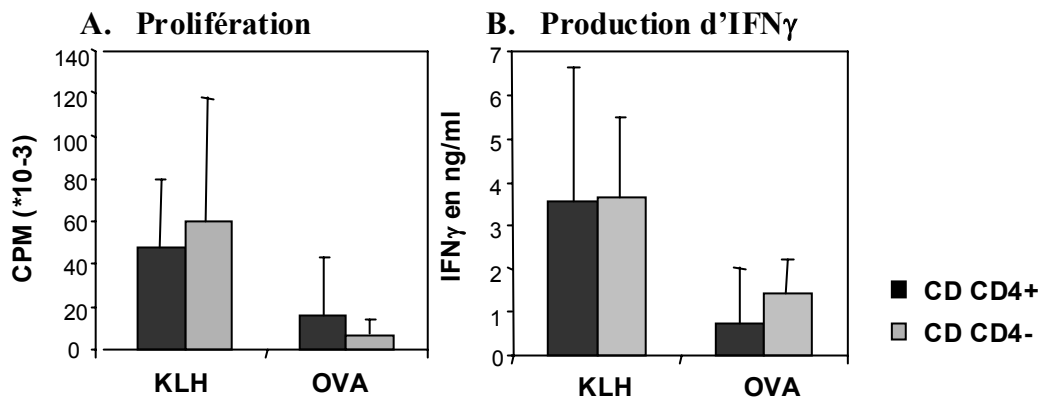
**Figure 10:** Phénotype des DC OX62 spléniques après injection de LPS. Des animaux sont injectés en IP avec 100 µg de LPS pour 100g de poids corporel. Après 24 ou 48 heures, les DC OX62 spléniques sont extraites comme décrit précédemment et leur phénotype est analysé par FACS.

- **Différenciation T induite par les sous-populations de cellules dendritiques OX62 spléniques *in vivo*.**

Nous avons également analysé la différenciation des lymphocytes T induite par chaque sous-population de DC OX62 *in vivo* (figure 11). Des DC CD4<sup>+</sup> et CD4<sup>-</sup> ont été triées par billes magnétiques après déplétion sélective avec une pureté supérieure à 85% pour les DC CD4<sup>+</sup> et supérieure à 95% pour les DC CD4<sup>-</sup>. Les cellules chargées avec la protéine KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*) ont été injectées par voie sous cutanée dans les coussinets plantaires de rats syngéniques. A six jours, les ganglions lymphatiques drainant sont prélevés et les cellules ganglionnaires sont restimulées avec de la KLH ou une protéine contrôle. La prolifération des lymphocytes est mesurée à trois jours et les cytokines produites par les lymphocytes sont dosées à 48 heures de culture. Ces expériences ont des résultats très variables, en fonction des animaux, tant au niveau de la prolifération des lymphocytes au cours de la stimulation secondaire, qu'au niveau de la production de cytokines par ces lymphocytes. Comme le montre la figure 11, les lymphocytes stimulés avec les CD4<sup>+</sup> ou les CD4<sup>-</sup> prolifèrent plus après restimulation à la KLH par rapport à l'OVA, et ceci de manière significative, bien qu'il y ait une grande variabilité des CPM entre les animaux après la



restimulation à la KLH. Cette réponse spécifique à la protéine KLH indique que la KLH a été présentée aux lymphocytes T *in vivo* mais elle ne confirme pas que ce sont les DC qui ont réalisé cette présentation. La production d'IFN $\gamma$  au cours de la stimulation secondaire est importante. Les lymphocytes T stimulés avec les DC CD4 $^-$  produisent de grandes quantités d'IFN $\gamma$  en réponse à la KLH de manière significative par rapport à l'OVA. Au contraire les lymphocytes T stimulés avec les DC CD4 $^+$  produisent des quantités très variables d'IFN $\gamma$  après la restimulation à la KLH et leur réponse semble moins spécifique. La production d'IL-10 par ces lymphocytes stimulés par les deux populations de DC est également extrêmement variable (DC CD4 $^+$  : 0 à 553 pg/ml; CD4 $^-$  : 0 à 1730 pg/ml) et n'est pas différente entre la KLH et la protéine contrôle (résultats non montrés). Sur trois animaux, nous n'avons pas observé de production de la cytokine Th2, l'IL-13, ce qui suggère que les DC OX62 entraînent une différenciation de type Th1 *in vivo*.



**Figure 11:** Influence des différentes populations de DC sur la différenciation des lymphocytes T helper *in vivo*. Des DC CD4 $^+$  et CD4 $^-$ , triées par FACS et incubées pendant 2 heures à 37°C avec de la KLH (50  $\mu$ g/ml) dans du milieu RPMI complet avec 10% de SVF, sont injectées ( $3 \times 10^5$ ) en sous cutanée dans des coussinets plantaires de rats syngéniques. Après six jours les ganglions poplités sont prélevés et les cellules ganglionnaires sont restimulées avec différentes doses de KLH ou de protéine contrôle (OVA) dans du milieu RPMI complet avec 2% de serum de rat. La prolifération des lymphocytes T est mesurée à 3 jours par incorporation de thymidine tritiée et les cytokines (IFN $\gamma$ , IL10, et IL13) sont dosées par test ELISA à 48 heures. Les résultats représentent les moyennes et les déviations standard de 11 animaux pour les tests de prolifération et de 6 et 11 animaux injectés respectivement avec des DC CD4 $^-$  et CD4 $^+$  pour la production d'IFN $\gamma$ .

L'ensemble de ces résultats ne nous permet pas de déterminer clairement la capacité de chaque sous-population de DC à induire un priming *in vivo*. La variabilité de ces résultats peut être expliquée par plusieurs éléments. D'une part, il est possible que l'hétérogénéité des populations, en particulier des DC CD4<sup>+</sup>, entraîne une hétérogénéité des réponses, d'autant que la pureté des cellules reste variable entre les différentes expériences. D'autre part, les deux sous-populations de DC ont une viabilité très différente au cours de leur maturation, or ces cellules mûrissent lorsqu'on les injecte *in vivo* et un nombre différent de DC migre donc jusqu'au ganglion poplité. De plus, nous avons également observé une variation de la viabilité en fonction des purifications de DC. Enfin ce modèle ne semble pas le plus adapté pour mesurer la stimulation *in vivo*. En effet, il ne nous permet pas de faire la part entre la présentation de la KLH de manière directe ou indirecte et il est fort possible que les DC, qui meurent après l'injection, soient phagocytées par d'autres DC et que leurs antigènes soient présentés dans le ganglion poplité. Cette présentation indirecte de la KLH pourrait donc interférer avec la présentation directe, et ceci de manière variable (P. Kleindienst and T. Brocker, 2003).

### **Conclusion**

Comme précédemment décrit chez la souris, nous avons mis en évidence deux populations de DC spléniques qui possèdent un phénotype et des fonctions différents en particulier au niveau de la stimulation des lymphocytes T. Cependant les fonctions de ces sous-populations *in vivo* restent encore largement inconnues et de nombreux éléments manquent afin de comprendre le rôle de chacune de ces sous-populations au cours de la réponse immunitaire. De plus, la variabilité des résultats obtenus *in vivo* suggère que ces sous-populations de DC ne sont pas strictement homogènes. La localisation des DC dans les organes lymphoïdes nous permettrait de déterminer si plusieurs localisations existent pour une

même sous-population de DC et nous permettrait d'observer les migrations et le phénotype engendrées par un stimulus de maturation. En effet, bien qu'*in vitro* les deux populations de DC CD4<sup>+</sup> et CD4<sup>-</sup> ne semblent pas représenter deux états de maturation de la même population de DC, il serait intéressant de le confirmer *in vivo*. Le groupe de McPherson a néanmoins démontré que les DC CD4<sup>+</sup> et CD4<sup>-</sup> de la lymphe suivaient des voies de différenciation indépendantes (L. Liu, et al., 1998). De la même manière, l'induction d'une différenciation de cellules T helper particulières par les sous-populations de DC *in vivo* n'est pas clairement définie. Les DC CD4<sup>-</sup>, comme les DC CD8<sup>+</sup> de la souris (A.D. McLellan, et al., 2002) (R. Maldonado-Lopez, et al., 1999), sont les principales cellules productrices d'IL-12p70 et induisent une réponse Th1 *in vitro*. Cependant, il est maintenant très clair que les populations de DC sont dotées d'une grande plasticité (A. Boonstra, et al., 2003) et il serait intéressant de tester les différentes réponses T engendrées par les DC CD4<sup>+</sup> et CD4<sup>-</sup> en fonction de différents types de pathogènes. L'expression des TLR par ces sous-populations de DC montre qu'elles sont capables de répondre à une grande variété de pathogènes et suggère fortement qu'elles ne correspondent pas aux DC plasmacytoïdes chez le rat.

III.2. Identification et caractérisation d'une population de leucocytes ayant les caractéristiques des cellules dendritiques dites plasmacytoïdes ou IPC.

#### **III.2.1. Article n°4 : Hubert et al. soumis pour publication.**

**Rat Plasmacytoid Dendritic Cell are an Abundant Subset of MHC  
ClassII<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> OX62<sup>-</sup> and Immature Dendritic Cells that  
Exhibit Selected Expression Toll Like Receptors 7 and 9 and  
Strong Responsiveness to CpG.**

**Francois-Xavier Hubert, Cécile Voisine, Michèle Heslan and Régis Josien**

**Soumis pour publication**

**Non référencé dans Pubmed le 7 janvier 2004**

**Rat Plasmacytoid Dendritic Cells are an Abundant Subset of MHC Class  
II<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> OX62<sup>-</sup> and Type-I IFN-Producing Cells that Exhibit  
Selective Expression of Toll-like Receptors 7 and 9 and Strong  
Responsiveness to CpG <sup>1</sup>**

Francois-Xavier Hubert, Cécile Voisine, Michèle Heslan and Régis Josien<sup>2</sup>

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unit 437 and Institut de Transplantation et  
de Recherche en Transplantation (ITERT), Nantes, France

Keyword: Rodent - Dendritic cell – Th1/Th2 cells - Cytokine – Spleen and lymph nodes

Running title: Rat plasmacytoid dendritic cells

Correspondence to : Dr. Régis Josien, INSERM U437, 30 boulevard Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 1,  
France. Email: [rjosien@nantes.inserm.fr](mailto:rjosien@nantes.inserm.fr)

## Résumé de l'article 4

Nous avons identifié une nouvelle sous-population de cellules CMH de classe II<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup> parmi les splénocytes qui produit de grandes quantités d'IFN $\alpha$  après une stimulation virale et qui est homologue aux cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) précédemment décrites chez l'homme et chez la souris. Ces cellules ont le phénotype suivant : CD5<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD45R<sup>+</sup>, CD45RC<sup>+</sup>, CD11c<sup>-</sup>, CD161a<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, CD172a<sup>+</sup>, CD32<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup>. Les pDC de rat n'expriment pas l'OX62 (CD103) et sont plus abondantes dans la rate que populations de DC CD4<sup>+</sup> et CD4<sup>-</sup> classiques que nous avons déjà décrit et qui sont de faibles productrices d'IFN $\alpha$ . Les pDC de la rate ont une morphologie peu différenciée mais acquièrent de nombreuses dendrites et une plus forte expression du CMH de classe II et des molécules CD80, CD86 et CD40 après stimulation avec des ODN aux motifs CpG. Ces cellules produisent de grandes quantités d'IFN $\alpha$  lorsqu'elles sont stimulées par le virus influenza et le CD40L mais les CpG et le poly(I:C) sont de faibles inducteurs de cette cytokine. L'IL-12p40 et l'IL-6 sont également sécrétées par les pDC stimulées par les CpG et le CD40L mais pas par le virus influenza. Les pDC ne produisent pas d'IL-12p70 ni de TNF $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$  et d'IL-10. Elles expriment spécifiquement les TLR7 et TLR9 en grandes quantités et de faibles quantités de TLR1, ce qui corrèle avec leur sensibilité aux CpG et aux virus. Les pDC spléniques fraîchement extraites induisent une prolifération modérée et une différenciation Th1 des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> allogéniques, mais une très faible prolifération et production d'IFN $\gamma$  des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> allogéniques. Nous avons donc décrit une nouvelle sous-population de DC majeure chez le rat qui possède les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des DC plasmacytoïdes.

### III.2.2. Discussion.

Nous avons identifié les pDC chez le rat qui ont des caractéristiques communes avec les pDC des autres espèces. Elles représentent la population majoritaire dans la rate et se distinguent des DC CD4<sup>+</sup> et CD4<sup>-</sup> car elle n'expriment ni le CD11c, ni l'intégrine reconnue par l'anticorps OX62. De plus, les pDC de rat sont éliminées par le gradient de Nycodenz utilisé pour purifier les DC OX62<sup>+</sup>. Les pDC sont capables de produire de l'IL-12p40 mais pas d'IL-12-70 et confirme que la population de DC CD4<sup>-</sup> est la seule population à produire de l'IL-12 bioactive dans la rate chez le rat. Cependant quelques nuances sont à apporter quant à la production de l'IL-12p40 par les DC CD4<sup>+</sup>. En effet les DC CD4<sup>+</sup>, utilisées dans cette étude comme référence pour la stimulation T, ont été triées par FACS en fonction de leur expression des marqueurs CD4 et CD11b contrairement à précédemment (Trinité et al., Voisine et al.) où elles étaient triées en fonction des marqueurs CD4 et CMH de classe II. Il semble en fait que les DC CD4<sup>+</sup> triées de cette manière produisent de l'IL-12p40 avec des stimuli différents comme le SAC, le CD40L ou les CpG. Il est donc possible que les anticorps et en particulier l'anti CMH de classe II influent sur la fonction de ces cellules. En outre, il a été montré que les anti CMH de classe II pouvaient entraîner la mort des DC (N. Bertho, et al., 2000). Néanmoins, la différenciation T induite par les DC CD4<sup>+</sup> ne semble pas être altérée par cette technique de tri. Ces cellules induisent des lymphocytes T qui sécrètent de l'IFN $\gamma$  et de l'IL-13 et nous avons pu déterminer grâce au FACS intracellulaire que cette différenciation correspond plutôt à un profil Th1/Th0 qu'à un profile Th1/Th2.

## **DISCUSSION**



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. Trois sous-populations de DC ont été définies par l'expression des molécules CD4 et CD11b : les populations CD4<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> et une population CD4<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> qui correspond aux DC plasmacytoïdes de rat. Ces trois sous-population de DC sont également retrouvées dans les ganglions lymphatiques. Leurs fonctions ont été étudiées *in vitro* et dans une moindre mesure *in vivo* (tableau 5).

Les DC CD4<sup>-</sup> expriment le CD11c, elles sont négatives pour le SIRP $\alpha$  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. Ces DC sont capables de maturer spontanément en culture et expriment alors fortement le CMH de classe II et des niveaux intermédiaires des molécules CD40, CD80 et CD86. Les DC CD4<sup>-</sup> semblent être les principales cellules productrices d'IL-12 dans la rate en réponse à une stimulation par le LPS, le CD40L, le SAC ou les CpG. Leur sensibilité à ces différents stimuli reflète leur expression d'un large répertoire de TLR (TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). Les DC CD4<sup>-</sup> induisent une prolifération et une différenciation *in vitro* de lymphocytes T CD4 allogéniques en cellules Th1. Toutefois, elles induisent une faible prolifération des lymphocytes T CD8 qui est cependant augmentée après l'ajout de CD40L. De plus, cette population de DC se caractérise par une activité cytotoxique contre des cellules tumorales *in vitro* dont le mécanisme est indépendant du Ca<sup>2+</sup> et des caspases. Les DC CD4<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> coexpriment les marqueurs CD5 et SIRP $\alpha$ . Elles possèdent, comme les DC CD4<sup>-</sup>, un phénotype relativement immature. Ces DC ne produisent pas d'IL-12 bioactive mais sont capables de produire de l'IL-12p40 en réponse aux SAC et au CD40L. Elles possèdent un profil d'expression des TLR relativement similaire aux DC CD4<sup>-</sup> mais expriment plus de

TLR8 et de TLR9 que les DC CD4<sup>-</sup>. Les DC CD4<sup>+</sup> induisent la prolifération et la différenciation des lymphocytes T CD4 en cellules Th1/Th0 et induisent des cellules T CD8 produisant de grandes quantités d'IFN $\gamma$ . Les DC CD4<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> sont la population majeure dans la rate. Ces DC n'expriment pas l'OX62 ni le CD11c mais sont positives pour des marqueurs lymphoïdes, comme le CD45, CD5 et le CD90, et myéloïdes, comme le CD200 et le SIRP $\alpha$ . Ces cellules sont capables de produire d'énormes quantités d'IFN $\alpha$  après stimulation avec un virus. Elles produisent également de l'IL-12p40 après stimulation avec des CPG ou du CD40L. Elles expriment spécifiquement les TLR7 et 9 comme les pDC humaines. Ces DC fraîchement extraites sont capables d'induire une faible prolifération des lymphocytes T CD4 allogéniques qui se différencient en cellules Th1. Cependant, elles induisent une très faible prolifération des cellules T CD8 qui produisent alors de petites quantités d'IFN $\gamma$ . Ces DC ont toutes les caractéristiques de DC plasmacytoïdes.

Population	DC		
	CD4- CD11b+	CD4+ CD11b+	plasmacytoïdes
<b>Phénotype</b>	CD4-	CD4+	CD4+
	CD8-	CD8-	CD8-
	CD5	CD5+	CD5+
	CD90+/-	CD90+	CD90+
	CD45R-	CD45R-	CD45R+
	CD161a+	CD161a+	CD161a+
	CD11b+	CD11b+	CD11b-
	CD11c+	CD11c+	CD11c-
	OX62+	OX62+	OX62-
	CD62L-	CD62L-	CD62-/+
	CD40-	CD40-	CD40-
	CD80-/+	CD80+	CD80-
	CD86-	CD86-	CD86-/+
	CMH cl II+	CMH cl II+	CMH cl II+
SIRP $\alpha$ -	SIRP $\alpha$ +	SIRP $\alpha$ +	
CD200+	CD200-	CD200+	
<b>Expression des TLR</b>	TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10	TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10	TLR 1, 7, 9
<b>Localisation dans la rate</b>	Zone T pulpe rouge	Couronne autour de la zone T	?
<b>Fonctions</b>			
-Phagocytose	++	+	?
-Cytotoxicité	++	-	?
-Sécrétion d'IFN $\alpha$	-	-	+++
-Sécrétion d'IL-12p70	++	-	-
-Sécrétion d'IL-12p40	++	+	++
-Sécrétion d'IL-6	?	?	++
-Priming TCD4	++	+++	+
-Priming TCD8	-	+++	+/-
-Cross priming	?	?	?
-Différentiation Th (DC fraîches)	Th1	Th1/Th0	Th1

Tableau 5 : Caractéristiques des sous-populations de DC spléniques chez le rat

## **I. La population de DC CD4<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup>.**

### **Quel rôle l'activité cytotoxique confère-t-elle aux DC CD4<sup>-</sup> in vivo ?**

L'activité cytotoxique originale de certaines DC a déjà été décrite par d'autres équipes, cependant il n'existe aucune preuve de l'existence de cette fonction des DC in vivo. De plus, si cette fonction est réelle in vivo, son rôle est à déterminer. Deux hypothèses peuvent être envisagées pour intégrer une telle fonction dans l'activité des DC : l'activité cytotoxique pourrait jouer un rôle dans l'initiation d'une réponse anti-tumorale par les DC ou pourrait participer à l'induction de la tolérance au soi par les DC.

#### Activité cytotoxique des DC CD4<sup>-</sup> et fonction anti-tumorale.

De nombreuses études chez l'homme montrent que certaines DC sont capables d'exercer une activité cytotoxique contre des cellules tumorales (S. Liu, et al., 2001, N.A. Fanger, et al., 1999, P.O. Vidalain, et al., 2001, B.M. Janjic, et al., 2002) venant confirmer nos travaux initiaux (R. Josien, et al., 1997). Ces études suggèrent que les DC cytotoxiques peuvent avoir une réelle fonction anti-tumorale *in vivo*. Cependant, la plupart des études utilisent des DC générées et/ou activées *in vitro* et sont difficilement interprétables *in vivo*. L'activité cytotoxique que nous avons mis en évidence dans les DC CD4<sup>-</sup> est différente de celle déjà décrite dans d'autres modèles. En effet, d'une part cette activité cytotoxique est naturelle et ne nécessite aucune activation des DC, ce qui suggère qu'elle existe *in vivo*, et d'autre part elle n'utilise pas un mécanisme classique d'apoptose induite par le système granzyme perforine ou des molécules connues de la famille du TNF comme la molécule TRAIL qui est impliquée dans l'activité des DC humaines. De plus, les DC cytotoxiques sont capables de phagocyter leurs cibles. Plusieurs études montrent que les DC phagocytent des cellules mortes (R.M. Steinman and K. Inaba, 1999) et sont capables de présenter leur

antigènes aux lymphocytes T CD8 et d'induire des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques (M.L. Albert, et al., 1998a), (M.L. Albert, et al., 1998b).

Les caractéristiques des DC CD4<sup>-</sup> suggèrent qu'elles sont de bons candidats comme outil en immunothérapie anti-tumorale. En effet, la lyse des cellules tumorales *in vitro* et leur ingestion peut conduire à une présentation d'un large panel d'antigènes tumoraux sur les molécules de CMH de classe I et/ou de classe II, ce qui est un des buts majeurs des vaccins anti-tumoraux. De plus, ces cellules, après stimulation *in vitro*, produisent de l'IL-12 et sont donc susceptibles d'induire une réponse Th1. Il serait donc intéressant de mesurer l'effet anti-tumoral de ces cellules par un protocole de vaccination utilisant des DC CD4<sup>-</sup> qui ont tué et phagocyté leurs cibles dans un modèle de tumeurs solides chez le rat. Actuellement, nous essayons de mettre en place un tel modèle et nous envisageons de tester la capacité des DC CD4<sup>-</sup>, injectées directement dans la tumeur, à induire une réponse innée et adaptative anti-tumorale. De plus, les DC qui auront tué et phagocyté des cibles tumorales seront testées pour leur capacité à induire des lymphocytes T cytotoxiques *in vitro* et *in vivo*, une régression de la taille des tumeurs, une augmentation de la survie des animaux et la génération de lymphocytes T mémoires.

Il a été montré que l'injection de DC immatures à des volontaires sains entraîne l'inhibition de la réponse des cellules T CD8 contre un peptide viral (M.V. Dhodapkar, et al., 2001). L'état de maturation des DC est donc capital dans ces protocoles d'immunothérapie. Les DC CD4<sup>-</sup> qui ont tué leur cible *in vitro* ont un phénotype relativement mature qui est certainement dû à une maturation spontanée des DC en culture. De même, les DC fraîchement extraites mûrissent quand on les injecte *in vivo*. Les DC CD4<sup>-</sup> sont donc des DC qui réunissent de nombreux critères de réussite pour une vaccination anti-tumorale.

Paradoxalement, il semble peu probable que les DC CD4<sup>-</sup> jouent un rôle important dans l'élimination des tumeurs *in vivo* de manière naturelle en particulier du fait de leur stade

de maturation. En effet, les DC CD4<sup>-</sup> sont des cellules immatures qui possèdent *in vitro* de faibles capacités de stimulation des cellules T CD8. De plus, les tumeurs ont développé de multiples stratégies pour échapper au système immunitaire et ne peuvent pas être à l'origine d'un stimulus de maturation pour les DC CD4<sup>-</sup>. *In vivo*, la situation pourrait donc être radicalement différente. En effet, le concept actuel est que les DC immatures entraînent la tolérance (M.B. Lutz and G. Schuler, 2002, R.M. Steinman and M.C. Nussenzweig, 2002) et il a été montré que des DC qui ont capturé des cellules apoptiques induisent une tolérance (R.M. Steinman, et al., 2000). Ainsi, les DC CD4<sup>-</sup> qui n'ont pas reçu de stimulus de maturation dans les tissus, pourraient être responsables de l'induction d'une tolérance vis à vis des antigènes tumoraux. Il a été montré récemment que des patients atteints de cancer possèdent un plus grand nombre de lymphocytes T régulateurs sanguins fonctionnels que des patients sains (A.M. Wolf, et al., 2003) Des études antérieures avaient déjà montré, chez la souris, un effet de cellules T régulatrices sur la réponse anti-tumorale (J. Steitz, et al., 2001) et des lymphocytes T anergiques spécifiques des antigènes tumoraux sont induits au cours de la croissance tumorale (K. Staveley-O'Carroll, et al., 1998). La tolérance vis à vis des cellules tumorales est donc un phénomène actif qui pourrait mettre en cause les DC immatures capables d'induire des lymphocytes anergiques ou régulateurs. De plus cette induction de tolérance peut être augmentée par des facteurs produits par la tumeur comme l'IL-10 et le TGF $\beta$  (K.D. Elgert, et al., 1998) qui peuvent agir sur les lymphocytes T mais aussi directement sur les DC qui infiltrent les tumeurs. En effet, chez l'homme, les DC dérivées des monocytes traitées à l'IL-10 entraînent une anergie des lymphocytes T CD4 et TCD8 (K. Steinbrink, et al., 1997). Les DC CD4<sup>-</sup> *in vivo* pourraient donc être, si elles sont capables de tuer puis d'ingérer une cible, plus susceptibles de provoquer une tolérance vis à vis des antigènes tumoraux et leur rôle dans l'initiation d'une réponse anti-tumorale innée et adaptative semble peu probable.

### Activité cytotoxique et tolérance périphérique au soi.

Comme on l'a vu précédemment, les DC immatures, lorsque l'organisme est au repos, permettent probablement le maintien de la tolérance au soi. Les DC immatures ne se comportent pas uniquement comme des sentinelles dans les tissus mais migrent en permanence de la périphérie vers les organes lymphoïdes. Il a été proposé que, *in vivo*, les DC immatures acquièrent des antigènes du soi à la périphérie et les présentent de manière tolérogène dans les organes lymphoïdes (R.M. Steinman and M.C. Nussenzweig, 2002). Ainsi, les DC immatures qui migrent vers les organes lymphoïdes pourraient subir une maturation incomplète en l'absence de danger qui se traduit par une augmentation de la molécule CCR7, une présentation des antigènes sur les molécules de CMH I et II mais une très faible expression des molécules de costimulation (I. Verbovetski, et al., 2002, C. Scheinecker, et al., 2002). Ce type de DC est donc armé pour induire une tolérance (K.A. Frauwirth, et al., 2000). L'équipe de McPherson a montré, chez le rat, que des DC CD4<sup>-</sup> SIRPα<sup>-</sup> de la lymphe intestinale afférente migrent vers les ganglions lymphatiques de manière continue et constitutive en transportant des corps apoptotiques de cellules épithéliales intestinales, ce qui suggère un rôle important de ces cellules dans le maintien de la tolérance au soi (F.P. Huang, et al., 2000). Ces DC partagent de nombreuses caractéristiques avec les DC CD4<sup>-</sup> de la rate (L. Liu, et al., 1998) En effet, ces DC possèdent un phénotype relativement identique : elles expriment l'OX62 et le CD11b/c et sont négatives pour le SIRPα et le CD4. De plus ces DC partagent le même type de morphologie, montrant de nombreuses inclusions cytoplasmiques et leur faible capacité à induire une prolifération des lymphocytes T (L.M. Liu and G.G. MacPherson, 1995). Il semble donc que les deux populations de DC CD4<sup>-</sup>, de la rate et de la lymphe, soient les mêmes populations de DC mais qu'elles dérivent d'organes différents. L'activité cytotoxique des DC CD4<sup>-</sup> pourrait alors être

le mécanisme par lequel les DC acquièrent des antigènes du soi. En effet, la manière dont les DC immatures captent les antigènes du soi n'a pas été clairement déterminée. Il a été montré que les DC qui phagocytent des cellules mortes réalisent une présentation croisée des antigènes du soi et sont capables de les présenter de manière tolérogène (K. Inaba, et al., 1998, M.B. Lutz and G. Schuler, 2002) (G.T. Belz, et al., 2002). Cependant, la probabilité pour qu'une cellule apoptotique des tissus rencontre une DC est très faible. De plus, dans les tissus, les phagocytes les plus nombreux sont les macrophages et dans les tissus à fort renouvellement les cellules voisines peuvent capturer les cellules apoptotiques (N. Platt, et al., 1998). Nous souhaitons donc émettre ici l'hypothèse que l'activité cytotoxique des DC sert à tuer des cellules des tissus qui sont ensuite phagocytées et dont les antigènes seront présentées dans les ganglions drainant afin de tolérer les cellules T auto-réactives. Il serait intéressant de mesurer l'activité cytotoxique des DC CD4<sup>-</sup> de la lymphe afférente. De plus, la nature des cellules tuées reste à être déterminer. Ces cellules pourraient être des cellules vieillissantes, par exemple. A l'heure actuelle, nous n'avons montré aucune activité cytotoxique sur des lymphocytes T normaux de rats naïfs ou activés ce qui semble exclure, d'autre part, une induction de tolérance via une lyse des cellules T. De plus, les résultats montrant une apoptose des lymphocytes TCD4 induite par les DC n'ont pu être reproduits. (G. Suss and K. Shortman, 1996). Notre étude des cellules cibles des DC cytotoxiques s'est surtout portée sur la nature des cibles tumorales. Il serait donc intéressant d'étudier l'activité cytotoxique des DC contre des cellules normales de différentes natures (cellules de différents tissus, cellules en prolifération, cellules souches ou en fin de vie) afin de vérifier l'hypothèse de ce mécanisme. De plus, il serait intéressant d'étudier quels sont les lymphocytes induits après la lyse de cellules normales par les DC CD4<sup>-</sup>, si elle a lieu. Une stimulation de lymphocytes allogéniques par les DC *in vitro* entraînent des lymphocytes T CD4 qui produisent de l'IFN $\gamma$  et de l'IL-10. Chez l'homme il a été montré que de tels lymphocytes possédaient une



activité régulatrice (M.K. Levings, et al., 2001). Cependant, la signification de l'IL-10 chez le rat n'est pas clairement définie. De plus les DC CD4<sup>-</sup> produisent de l'IL-12 et il semble donc que dans ces conditions les DC CD4<sup>-</sup> induisent une réponse de type Th1.

#### Mécanisme de la fonction cytotoxique des DC CD4<sup>-</sup>.

Nous avons montré que les DC CD4<sup>-</sup> fraîches possèdent une activité cytotoxique indépendante du système granzyme/perforine et qui ne passe pas par les molécules de la famille du TNF : FasL, TRAIL et TNF $\alpha$ . Depuis, d'autres molécules de cette famille ont été testées et il apparaît que la cytotoxicité des DC n'implique ni la molécule TWEAK ni la lymphotoxine  $\beta$ . En outre, nous avons montré que l'apoptose induite par les DC était indépendante de la caspase 8 et que des cellules cibles surexprimant Bcl2 étaient tuées par les DC. D'autres résultats montrent que la molécule cytotoxique n'est pas une molécule préformée dans les DC et qu'elle est synthétisée au cours du test cytotoxique. De plus, cette molécule n'est pas sécrétée et un contact cellulaire est nécessaire pour la lyse des cibles. A l'heure actuelle l'hypothèse est que la lyse par les DC est due à une molécule inconnue qui induit l'apoptose de certaines cellules cibles exprimant son récepteur et qui est synthétisée par la DC au contact des cellules cibles. Nous analyserons donc les voies moléculaires de l'apoptose dans les cellules cibles en portant un intérêt particulier pour les molécules effectrices capables d'induire l'apoptose indépendamment des caspases comme AIF (I.S. Mathiasen and M. Jaattela, 2002).

Les DC phagocytent également leur cible et il est possible qu'elles induisent une mort par phagocytose. En effet, un très grand nombre de cibles est phagocyté pendant le test cytotoxique et ce parfois même avant que l'on détecte de l'apoptose. Toutefois, il a été montré que dans les tissus les cellules apoptotiques sont phagocytées très rapidement avant même la

fragmentation de l'ADN en raison des dangers que représentent de telles cellules (N. Platt, et al., 1998).

De plus, le mécanisme de cytotoxicité semble être différent lorsque les DC sont cultivées. En effet les DC purifiées par une technique classique comprenant une nuit de culture possèdent un mécanisme dépendant du  $\text{Ca}^{2+}$  suggérant une action via le système granzyme/perforine (R. Josien, et al., 1997). Les DC fraîchement purifiées avec l'anticorps OX62 puis cultivées une nuit montre le même mécanisme. Cependant, l'activité cytotoxique dans ce cas est largement diminuée. Il semble donc que le mécanisme de cytotoxicité varie en fonction de la maturation des DC puisque ces cellules mûrissent spontanément en culture. L'interprétation de ces résultats est difficile car l'étape de culture est très peu physiologique et la correspondance entre les DC OX62 matures et les DC purifiées par la méthode classique n'est pas claire. Ces résultats sont également en contradiction avec de nombreuses études qui montrent que les DC ont besoin d'être activées pour exercer leur fonction cytotoxique (S. Liu, et al., 2001, N.A. Fanger, et al., 1999). Toutefois, il est possible que le mécanisme de cytotoxicité des DC immatures permette l'acquisition des antigènes du soi tandis que le mécanisme de cytotoxicité des DC matures permet une régulation de la réponse immune via la lyse de lymphocytes T. La nature des cibles tuées par les DC matures reste à être déterminée. L'identification du mécanisme de cytotoxicité des DC est donc une étape capitale dans la compréhension de la fonction de cette activité *in vivo*.

### **Quelles sont les DC tolérogènes ?**

L'ensemble de ces résultats soulève une question majeure. L'activité tolérogène des DC est-elle exercée par une population particulière de DC ou par l'ensemble des DC immatures. A ce sujet les études sont contradictoires. En effet, chez la souris il a été montré que la population de DC  $\text{CD}8^+$  était spécialisée dans la présentation croisée des antigènes.

Cette fonction semble liée à l'induction de tolérance par ces cellules et il a été montré que les DC CD8<sup>+</sup> spléniques induisaient une tolérance spécifique aux antigènes des cellules  $\beta$  pancréatiques (G.T. Belz, et al., 2002). Toutefois, d'autres études montrent que les DC CD8<sup>+</sup> ne sont pas les seules DC à réaliser cette fonction, et il a été montré que les DC CD8<sup>+</sup> classiques et les DC CD8<sup>faible</sup> de l'estomac transportaient et présentaient des antigènes du soi dans les ganglions (C. Scheinecker, et al., 2002). De plus, il a été montré que les DC CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> avaient un effet bénéfique sur l'EAE en induisant des lymphocytes T régulateurs via l'IL-10 (K.L. Legge, et al., 2002). Bien que l'on connaisse très peu la capacité de capture des antigènes par les pDC, il a été montré que ces DC peuvent induire des lymphocytes T régulateurs (M. Kuwana, et al., 2001). Au contraire, chez le rat il a été clairement défini que seules les DC CD4<sup>-</sup> de la lymphe afférente transportent des corps apoptotiques de cellules épithéliales et semblent impliquées dans la tolérance périphérique (F.P. Huang, et al., 2000). De la même manière, si l'activité cytotoxique des DC spléniques participe à ce processus, seules les DC CD4<sup>-</sup> seraient alors capables d'induire une tolérance. De plus, l'activité cytotoxique est observée également dans les DC CD4<sup>-</sup> des ganglions lymphatiques, ce qui suggère que cette activité n'est pas restreinte à la rate. Toutefois, l'état d'immaturation des DC semble essentiel. Les DC tolérogéniques pourraient représenter des populations de DC immatures particulières réparties dans différents tissus et dans le sang afin de permettre une présentation d'une grande variété d'antigènes du soi.

Les DC CD4<sup>-</sup> chez le rat pourraient donc être impliquées dans des phénomènes de tolérance, ce qui semble être également une caractéristique des DC spléniques CD8<sup>+</sup> chez la souris, même si ces résultats sont controversés.

## **A quelle population de DC correspondent les DC CD4<sup>-</sup> de rat chez l'homme et la souris ?**

L'identification des sous-populations de DC spléniques chez le rat permet de faire un parallèle avec les sous-populations de DC d'autres espèces. Les DC spléniques humaines ont été peu étudiées et il est donc difficile de comparer les sous-populations de DC spléniques de l'homme et du rat. De plus, la comparaison des DC entre ces deux espèces se heurte à une différence majeure de fréquence de contact avec les pathogènes. En effet, contrairement à l'homme, les animaux de laboratoire sont très peu soumis aux pathogènes ce qui influence certainement le phénotype des DC dans les organes lymphoïdes.

Chez la souris, les DC spléniques ont été largement étudiées et les DC CD4<sup>-</sup> partagent de nombreuses caractéristiques avec les DC CD8<sup>+</sup> murines (tableau 4 et 5). En particulier ces deux sous-populations de DC se caractérisent par une forte sécrétion d'IL-12 après stimulation, corrélée à une induction d'une différenciation des lymphocytes en cellules de type Th1. Elles sont également de faibles stimulatrices des lymphocytes T CD8 mais ne semblent pas induire une anergie de ces cellules. De plus, ces deux populations ont été mises en cause dans des phénomènes de tolérance au soi. Les DC CD8<sup>+</sup> sont également les seules DC spléniques de souris à exprimer l'intégrine CD103 qui a été assimilée à l'OX62 chez le rat. Cependant, l'OX62 ne reconnaît que la chaîne  $\alpha$  d'une intégrine commune à celle du CD103 et la correspondance entre l'intégrine « OX62 » et le CD103 reste à être déterminée. Toutefois, il est probable que les DC CD4<sup>-</sup> de rat correspondent à l'ensemble des DC CD4<sup>-</sup> chez la souris comprenant les DC CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> et les DC CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>. D'une part l'expression ou non du marqueur CD4 semble être important dans la définition des sous-populations puisqu'il est retrouvé sur les DC du rat, de la souris, et de l'homme. De plus, la morphologie des DC CD8<sup>+</sup> murines est plutôt celle d'une cellule de type lymphoïde, ce qui appuyait, il y a quelques années, les arguments pour une origine lymphoïde de ces cellules. Au contraire, les DC CD4<sup>-</sup> de rat ont une morphologie plutôt de type myéloïde comme les DC CD8<sup>-</sup> (CD4<sup>+</sup>

CD8<sup>-</sup> et CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>), la découverte de cette dichotomie des DC CD8<sup>-</sup> étant assez récente. Ces éléments sont encore assez confus, et de plus la localisation des DC spléniques de souris n'est pas encore clairement déterminée. Toutefois, les DC CD4<sup>-</sup> de rat pourraient contenir deux populations comme chez la souris, sur la base de l'expression d'un marqueur encore non déterminé. Paradoxalement, les DC CD4<sup>-</sup> du rat semblent assez homogènes phénotypiquement et morphologiquement cependant la localisation de cette population dans la rate suggère deux groupes de DC CD4<sup>-</sup> puisqu'elles sont présentes à la fois dans les zones T et dans la pulpe rouge. Ces deux sous-populations de DC CD4<sup>-</sup> pourraient avoir différentes fonctions lorsque l'organisme est au repos ou au cours d'une stimulation pathogénique.

### **Quel rôle jouent les DC CD4<sup>-</sup> au cours de l'immunité ?**

Le comportement des sous-populations de DC chez le rat lors de la rencontre d'un pathogène a été relativement peu étudié *in vivo*. Notre équipe a montré que les différentes sous-populations de DC entraînaient des réponses de T allogéniques différentes entre les sous-populations de DC mais les capacités plastiques de ces cellules face à différents pathogènes n'ont pas été encore explorées. L'étude des sous-populations de DC de la lymphé par le groupe de McPherson montre que les DC CD4<sup>+</sup> et CD4<sup>-</sup> sont des cellules qui migrent des tissus vers les ganglions et suggère que ces cellules ne soient pas des DC résidentes des organes lymphoïdes. De plus, l'étude par ce même groupe de la localisation de ces populations et en particulier des DC CD4<sup>-</sup> dans la rate et les ganglions d'animaux au repos ou injectés intra veineux (IV) avec du LPS nous permet de mieux comprendre l'organisation de la population de DC CD4<sup>-</sup> (E. Turnbull and G. MacPherson, 2001). Les DC CD4<sup>-</sup> sont les seules DC présentes dans les zones T de la rate et des ganglions en l'absence de toute stimulation, ce qui confirme que les DC CD4<sup>-</sup> interagissent avec les lymphocytes T dans les organes lymphoïdes en l'absence de toute stimulation (Schéma 1). Cependant, les DC CD4<sup>-</sup>

sont également présentes dans la pulpe rouge de la rate mais pas dans la zone médullaire des ganglions. La rate étant un organe qui filtre le sang, la fonction de ces DC CD4<sup>-</sup> pourrait être de capturer les antigènes sanguins. Cette population de DC CD4<sup>-</sup> migre dans les zones T après injection IV de LPS, ce qui confirme cette hypothèse. Toutefois, les DC CD4<sup>-</sup> présentes dans la pulpe rouge pourraient également, lorsque l'organisme est au repos, permettre la tolérance aux antigènes des cellules du soi présentes dans le sang. Dans les ganglions, qui ne sont pas des organes drainant les antigènes sanguins, la population DC CD4<sup>-</sup> n'est présente que dans les zones T. Les DC CD4<sup>-</sup> de la rate et des ganglions possèdent une activité cytotoxique et il serait donc intéressant de comparer les DC de la rate et des ganglions afin de caractériser les deux groupes de DC CD4<sup>-</sup> spléniques qui pourraient correspondre aux deux populations de DC CD4<sup>-</sup> chez la souris. En effet, ces cellules semblent être impliquées dans des processus différents : tolérance ou immunité et pourraient représenter soit deux stades différents de maturation soit des populations d'origine différentes. L'absence des DC CD4<sup>+</sup> ou CD4<sup>-</sup> dans les zones B suggère qu'elles ne jouent pas de rôle dans l'activation de ces lymphocytes dans ces conditions.

Les DC CD4<sup>+</sup> ont une localisation originale dans la rate. Cependant, elles migrent dans les zones T de la rate et des ganglions, ce qui suggère un rôle plus classique de cette population de DC au cours de l'immunité.

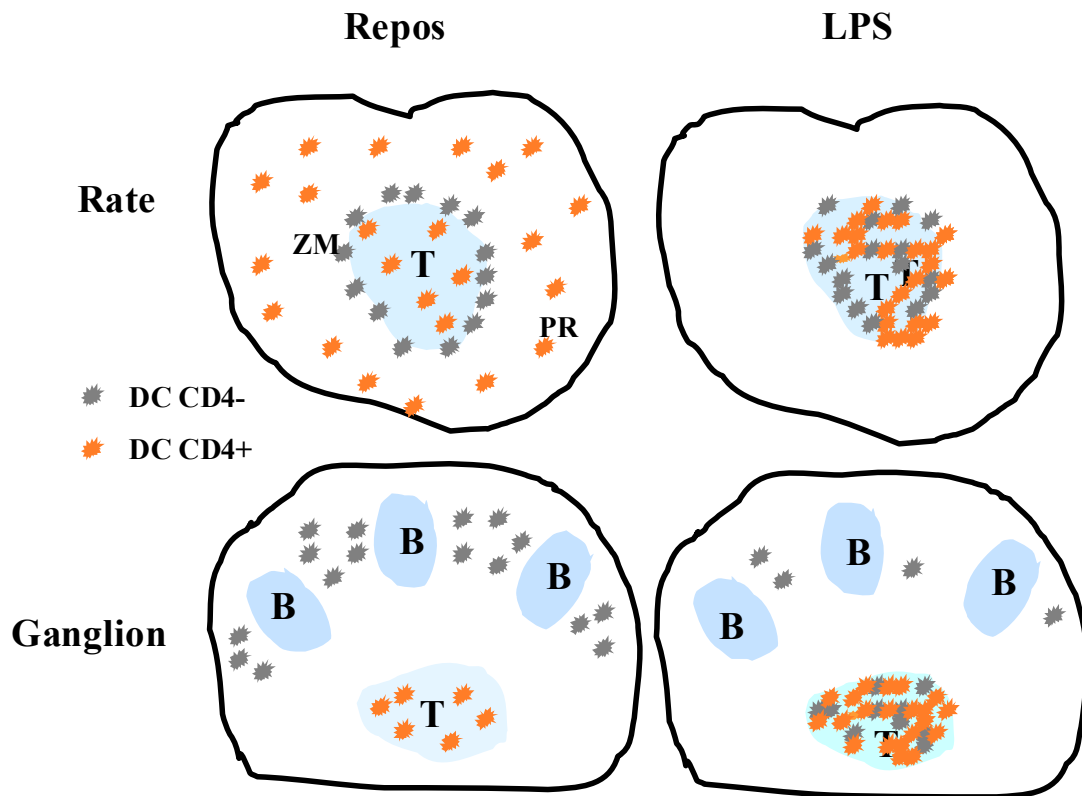


Schéma 1: Localisation des sous-populations de DC CD4<sup>+</sup> et CD4<sup>-</sup> dans les organes lymphoïdes secondaires.

## II. La population de DC CD4<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>

La sous-population de DC CD4<sup>+</sup> semblent posséder des fonctions plus classiques de DC.

### **A quelle population de DC correspondent les DC CD4<sup>+</sup> de rat chez la souris ?**

Parallèlement aux DC CD4<sup>-</sup> qui semblent correspondre aux DC CD8<sup>-</sup> de la souris, les DC CD4<sup>+</sup> partagent de nombreuses caractéristiques avec les DC CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> spléniques de la souris. En particulier, elles possèdent une faible capacité à produire de l'IL-12 et une forte capacité à induire une prolifération des lymphocytes T CD4 et T CD8. Cependant, les DC CD4<sup>+</sup> chez le rat n'induisent pas une différenciation des lymphocytes en cellules de type Th2,

comme c'est le cas pour les DC CD4<sup>+</sup> murines dans certaines conditions, mais induisent une réponse de type Th1/Th0 des lymphocytes T CD4 allogéniques (fig 9 Hubert et al. manuscrit en préparation). Comme la population de DC CD4<sup>-</sup>, la plasticité de ces DC n'a pas été réellement explorée et il est possible qu'elles soient capables d'induire une réponse de type Th2 dans d'autres conditions. Toutefois, chez le rat la difficulté d'observer une réponse Th2 est réelle et en particulier dans les rats Lewis qui ont été utilisés dans cette étude comme source de lymphocytes T allogéniques. En effet, il a été montré que les rats Lewis, contrairement aux rats de souche BN (*Brown Norway*), étaient plus susceptibles aux maladies auto-immunes d'origine Th1, ce qui traduit en fait une prédisposition génétique de ces rats à induire ce type de réponse (G.J. Fournie, et al., 2001). Cette différence qualitative du profil T semble être due aux lymphocytes T eux-mêmes et pas à la nature des DC. Il serait cependant intéressant d'étudier la réponse lymphocytaire induite par les DC CD4<sup>+</sup> avec des lymphocytes T issus d'animaux BN qui sont prédisposés à générer des réponses Th2

Les deux sous-populations de DC OX62<sup>+</sup> semblent être proches des sous-populations de DC observées chez la souris. On retrouve dans les deux espèces une population de DC spécialisée dans la production d'IL-12 et qui stimule faiblement les lymphocytes T CD8 et une population qui est une bonne stimulatrice des cellules T mais qui ne produit pas d'IL-12. De manière intéressante le même schéma a été observé dans les DC spléniques chez le bovin qui se répartissent en deux sous-populations de DC SIRPa<sup>+</sup> et SIRPa<sup>-</sup> et dont la population de DC SIRPa<sup>-</sup> stimulent faiblement les cellules T CD8 (J.C. Hope, et al., 2001).



### **III. La population de DC plasmacytoïdes CD4<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup>**

L'identification de la population de pDC de rat permet une comparaison directe avec les pDC chez l'homme puisque cette population de DC particulière a été très bien caractérisée dans le sang humain. Les pDC de rat possèdent des caractéristiques communes avec les pDC humaines mais aussi avec les pDC de souris. Comme chez l'homme, ces DC n'expriment ni le CD11c ni le CD11b. Elles se caractérisent également par leur expression restreinte des TLR et n'expriment que les TLR7 et TLR9 ce qui corrèle avec leur sensibilité au virus et aux CpG. Chez l'homme la sensibilité aux CpG est cependant plus restreinte car seules les pDC expriment le TLR9 alors que ce récepteur est exprimé par d'autres DC chez la souris et le rat (A. Krug, et al., 2001). Les pDC de rat expriment le CD45R qui est exprimé par les pDC de souris uniquement et les pDC de rat et de souris sont capables de produire de l'IL-12p40. Toutefois, chez le rat comme chez l'homme, ces cellules ne semblent pas produire d'IL-12 bioactive. En effet chez l'homme la production d'IL-12p70 par les pDC est controversée alors que les pDC de souris produisent de grandes quantités d'IL-12p70 (H. Hochrein, et al., 2002). Ces caractéristiques ne représentent pas des différences majeures entre les pDC des différentes espèces. Ces cellules sont toutes spécialisées dans la sécrétion de l'IFN $\alpha$  en réponse à un virus mais représentent certainement des adaptations spécifiques d'espèce induites par la diversité des pathogènes. Les pDC de rat, comme les pDC chez l'homme et chez la souris, sont de faibles stimulatrices des lymphocytes T. Il a également été suggéré qu'elles pourraient jouer un rôle dans l'induction d'une tolérance au soi. En effet, ces DC chez l'homme sont capables d'induire des lymphocytes T régulateurs (M. Gilliet and Y.J. Liu, 2002). Afin de tester le rôle de ces DC dans l'induction de la tolérance, il serait intéressant de montrer si ces DC ont un rôle au cours d'une greffe allogénique.

## **Les pDC sont elles des cellules dendritiques ?**

Les pDC ont d'abord été décrites comme des cellules spécialisées dans la production d'IFN $\alpha$  (IPC). Certaines caractéristiques les ont ensuite assimilées à des DC. Toutefois, leur appartenance à la population des DC n'est pas encore univoque et elles forment une population très particulière de DC en terme de fonction dans l'immunité innée, de migration, d'ontogenèse et de stimulation T (C. Asselin-Paturel, et al., 2001, G. Grouard, et al., 1997).

L'absence de marqueurs spécifiques d'autres lignées leucocytaires, leur expression des molécules du CMH de classe II, leur acquisition d'une morphologie de type dendritique après une stimulation et leur présence dans les organes lymphoïdes secondaires sont des arguments qui ont influencé leur identification à des DC (C. Asselin-Paturel, et al., 2001, G. Grouard, et al., 1997). Cependant, les pDC chez la souris et chez l'homme stimulent faiblement les lymphocytes T naïfs. Néanmoins, cette capacité à stimuler les cellules T naïves est la définition des DC et les pDC pourraient représenter une population de cellules présentatrices de l'antigène. Chez le rat, nous avons montré que les pDC stimulaient très faiblement la prolifération de lymphocytes T CD4 totaux et il est fort probable que cette population de cellules soient également de faibles stimulatrices des lymphocytes T naïfs dans cette espèce. De plus, la capacité de capture de l'antigène par les pDC semblent être moins efficace que celle des DC classiques (S.P. Robinson, et al., 1999). Ces résultats ont suggéré un modèle dans lequel les pDC ne stimuleraient pas les lymphocytes T naïfs mais permettraient la différenciation des lymphocytes Th0 stimulés préalablement avec des DC (A. Krug, et al., 2003). Un tel modèle est envisageable *in vivo* puisque les pDC se concentrent dans les organes lymphoïdes (G. Penna, et al., 2002) et qu'elles produisent de grandes quantités de cytokines. Toutefois les pDC ont été décrites dans de nombreuses maladies et sont capables de migrer vers les tissus inflammés ou vers les tissus exposés à un allergène ce qui suggère

qu'elles agissent directement sur le site de lésions des tissus et dans les organes lymphoïdes (F.L. Jahnsen, et al., 2002).

Il est fort probable que le débat sur l'appartenance des pDC à la famille des DC soit précoce et les pDC doivent d'abord être mieux caractérisées in vivo. En particulier, l'étude de leur différenciation en DC matures in vivo pourrait déterminer leur appartenance à la famille des DC. De plus, la distinction entre les précurseurs des pDC et les pDC doit être plus clairement déterminée. En effet, les précurseurs de DC ne possèdent pas les fonctions des DC cependant les préDC2 et les proDC2 produisent de fortes quantités d'IFN $\alpha$  en réponse à une stimulation virale (B. Blom, et al., 2002) et peuvent donc être assimilés, à tort, à une forme plus différenciée des pDC.

Les DC chez le rat possèdent de nombreuses similitudes avec les DC des autres espèces et il semble que le système des sous-populations de DC soit globalement le même entre l'homme, la souris et le rat. En outre, l'étude des DC de rat a permis de révéler quelques points communs entre les DC de rat et les DC de l'homme qui ne sont pas visibles chez la souris comme l'absence de l'expression du CD8 par les DC des organes lymphoïdes ou l'expression spécifique des TLR7 et TLR9 sur les pDC.

#### **IV. Pourquoi existe-t-il plusieurs sous-populations de DC ?**

Comme on l'a vu tout au long de cet exposé la diversité des DC est très grande et leur plasticité semble illimitée. La question de l'origine des sous-populations de DC fonctionnellement différentes se pose alors. Au cours de l'évolution, les mammifères ont dû s'adapter à la diversification des micro-organismes. Pour faire face à ces multiples agressions, mais également pour se contrôler lui-même, le système immunitaire a mis en place de

nombreuses stratégies et en particulier la famille des cellules dendritiques. Les DC sont capables d'une très grande plasticité. Elles peuvent induire des réponses lymphocytaires extrêmes Th1 ou Th2 et contrôlent également l'induction de la tolérance ou de l'immunité. Cependant une telle plasticité ne peut être contenue dans une seule cellule et il apparaît alors que ces différentes fonctions sont assumées par plusieurs sous-populations de DC différentes dans leur phénotype, leur fonction et leur localisation dans le micro-environnement.

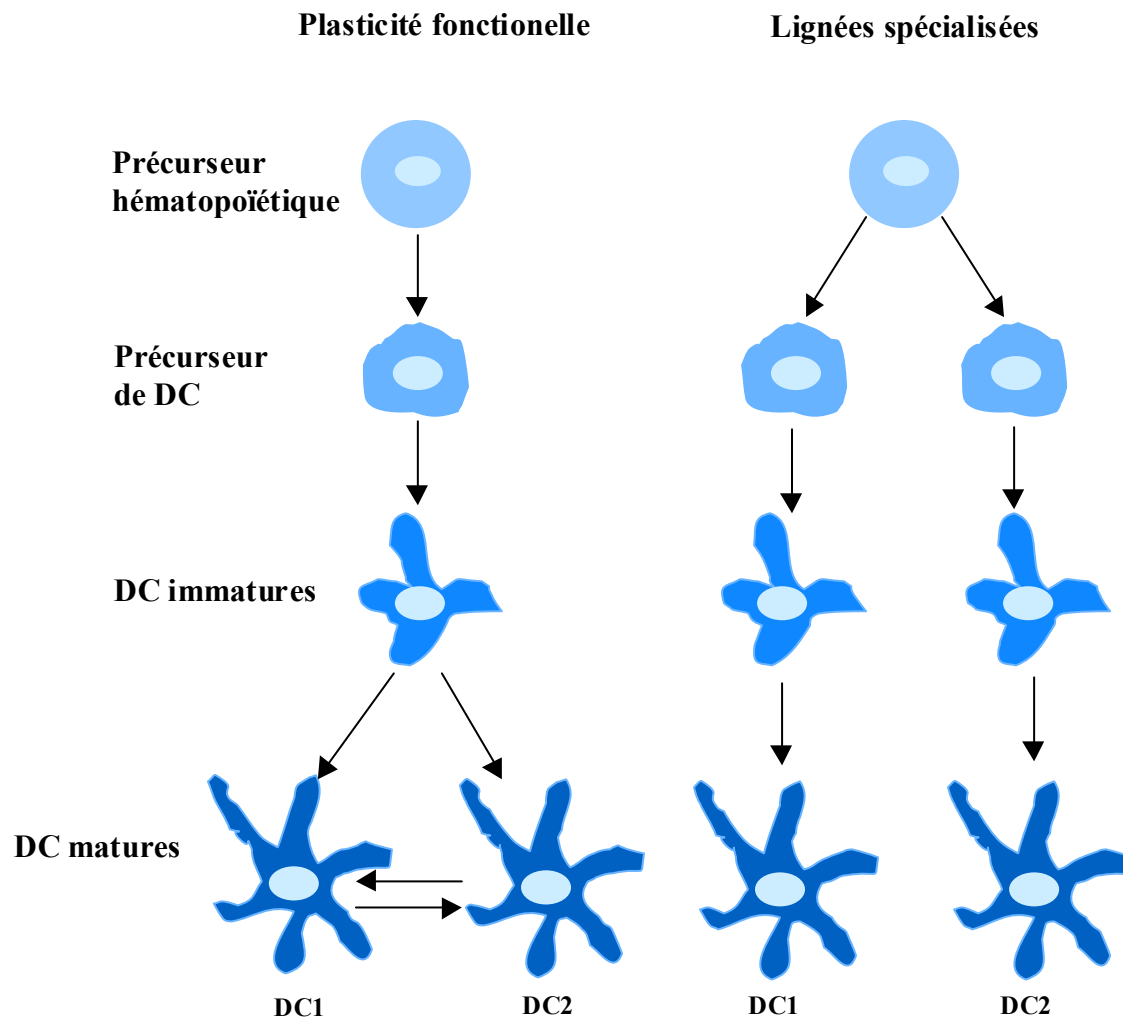
Plusieurs hypothèses ont alors été évoquées pour expliquer la régulation de la diversité des DC. Les concepts majeurs ont toujours été que la génération de différentes sous-populations de DC pourraient être le fruit du développement de lignées différentes ou pourraient être entièrement dictée par les facteurs du micro-environnement. Néanmoins, ces concepts ont évolué au fur et mesure de l'étude de la biologie des DC.

Il a d'abord été suggéré que les différentes sous-populations de DC pourraient être déterminées par leur origine tissulaire. En effet, il apparaît que le recrutement des DC dans différents tissus pourrait créer la différence entre les DC, qui sont alors soumis à différents pathogènes et facteurs environnementaux. Par exemple, il a été montré que les DC des épithélium respiratoires ou des plaques de peyer induisent une réponse de type Th2 tandis que les DC spléniques chez la souris induisent plutôt une réponse de type Th1 (P.A. Stumbles, et al., 1998, A. Iwasaki and B.L. Kelsall, 1999). Dans la peau, les cellules de Langerhans apparaissent comme des DC particulières par leur phénotype et leur renouvellement cellulaire (M. Merad, et al., 2002). De la même manière, les DC des intestins sont en contact permanents avec des cellules à fort renouvellement cellulaire et il a été mis en évidence que certaines DC issues de cet organe semblaient jouer un rôle dans la tolérance au soi (F.P. Huang, et al., 2000). Cependant, on sait maintenant qu'il existe des populations de DC fonctionnellement différentes à l'intérieur d'un même organe et l'origine tissulaire des DC ne

semble pas suffire pour expliquer la diversité et la plasticité des différentes sous-populations de DC (D. Vremec, et al., 1992).

D'autre part, il a été suggéré que les différentes populations de DC pourraient s'expliquer par leur origine hématopoïétique myéloïde ou lymphoïde (A. Galy, et al., 1995, K. Inaba, et al., 1992). Ce concept s'illustre particulièrement bien dans la rate de souris où les DC CD8<sup>+</sup> et CD8<sup>-</sup> semblaient posséder des origines différentes, respectivement lymphoïde et myéloïde, et des fonctions différentes (D. Vremec, et al., 2000). Toutefois il a été montré que ces populations de DC pouvaient dériver à la fois d'un précurseur lymphoïde ou myéloïde (L. Wu, et al., 2001). Actuellement, seule l'origine hématopoïétique des pDC semble être différente et pourraient se rapprocher de celle des lymphocytes T.

L'étude des fonctions et de l'ontogenèse des DC a permis de mieux comprendre comment le système des DC s'organise. A présent, deux concepts ont été proposés quant à la manière dont ces sous-populations sont induites (schéma 2). Le modèle de plasticité fonctionnelle ou modèle instructif associe les sous-populations de DC à différents stades de maturation d'une même lignée cellulaire dont les différences fonctionnelles dépendent entièrement des signaux de l'environnement. Ainsi les pathogènes et l'origine tissulaire des DC permettraient une adaptation de la réponse immune par les DC et leur stade de maturation détermineraient l'initiation de la tolérance ou de l'immunité. Au contraire, le modèle des lignées cellulaires ou modèle sélectif assimile les sous-populations de DC fonctionnellement différentes aux produits du développement de lignées cellulaires différentes. Le signal déterminant la différenciation de ces DC est donc très précoce puisque les précurseurs sont déjà fonctionnellement différents. Ce modèle s'illustre par exemple dans la découverte de précurseurs fonctionnellement différents (monocytes et pré-DC2) qui expriment un répertoire de TLR complémentaires, chez l'homme (N. Kadowaki, et al., 2001b).



**Schéma 2 :** Modèles alternatifs pour la génération de DC fonctionnellement différentes.

Toutefois, ces deux voies de différenciation des sous-populations de DC pourraient co-exister *in vivo* et s'entre croiser. Par exemple, il a été montré, chez la souris, que le TGF $\beta$  permet la surexpression du facteur de transcription *id2* nécessaire au développement de certaines DC (cellules de Langerhans et DC CD8<sup>+</sup> splénique) (C. Hacker, et al., 2003). Les facteurs du micro-environnement sont donc capables d'influencer la différenciation de lignées particulières de DC. La réponse immune *in vivo* semblerait être alors déterminée par l'état de maturation des DC, la sous-population de DC, le pathogène, et le micro-environnement.

La réalité apparaît donc comme être un fin mélange entre les deux concepts proposés et la plasticité fonctionnelle générale du système peut être attribuée aux DC et aux précurseurs de DC.

# **BIBLIOGRAPHIE**



- Akashi, K., D. Traver, T. Miyamoto, and I. L. Weissman. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404:193.
- Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2:675.
- Albert, M. L., M. Jegathesan, and R. B. Darnell. (2001). Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells. *Nat Immunol* 2:1010.
- Albert, M. L., S. F. Pearce, L. M. Francisco, B. Sauter, P. Roy, R. L. Silverstein, and N. Bhardwaj. (1998a). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 188:1359.
- Albert, M. L., B. Sauter, and N. Bhardwaj. (1998b). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392:86.
- Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov, and R. A. Flavell. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413:732.
- Anjuere, F., P. Martin, I. Ferrero, M. L. Fraga, G. M. del Hoyo, N. Wright, and C. Ardavin. (1999). Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, Peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse. *Blood* 93:590.
- Anjuere, F., G. Martinez del Hoyo, P. Martin, and C. Ardavin. (2000). Langerhans cells acquire a CD8+ dendritic cell phenotype on maturation by CD40 ligation. *J Leukoc Biol* 67:206.
- Ardavin, C. (1997). Thymic dendritic cells. *Immunol Today* 18:350.
- Ardavin, C., L. Wu, C. L. Li, and K. Shortman. (1993). Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* 362:761.
- Ariizumi, K., G. L. Shen, S. Shikano, R. Ritter, 3rd, P. Zukas, D. Edelbaum, A. Morita, and A. Takashima. (2000). Cloning of a second dendritic cell-associated C-type lectin (dectin-2) and its alternatively spliced isoforms. *J Biol Chem* 275:11957.
- Askew, D., R. S. Chu, A. M. Krieg, and C. V. Harding. (2000). CpG DNA induces maturation of dendritic cells with distinct effects on nascent and recycling MHC-II antigen-processing mechanisms. *J Immunol* 165:6889.
- Asselin-Paturel, C., A. Boonstra, M. Dalod, I. Durand, N. Yessaad, C. Dezutter-Dambuyant, A. Vicari, A. O'Garra, C. Biron, F. Briere, and G. Trinchieri. (2001). Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol* 2:1144.
- Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser. (1997). Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 15:675.
- Banchereau, J., A. K. Palucka, M. Dhodapkar, S. Burkeholder, N. Taquet, A. Rolland, S. Taquet, S. Coquery, K. M. Wittkowski, N. Bhardwaj, L. Pineiro, R. Steinman. (2001) Fay, J. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res* 61:6451.
- 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.

- Banchereau, J., and R. M. Steinman. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245.
- Basu, S., R. J. Binder, R. Suto, K. M. Anderson, and P. K. Srivastava. (2000). Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* 12:1539.
- Bates, E. E., N. Fournier, E. Garcia, J. Valladeau, I. Durand, J. J. Pin, S. M. Zurawski, S. Patel, J. S. Abrams, S. Lebecque, P. Garrone, and S. Saeland. (1999). APCs express DCIR, a novel C-type lectin surface receptor containing an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *J Immunol* 163:1973.
- Becker, Y. (1993). Dendritic cell activity against primary tumors: an overview. *In Vivo* 7:187.
- Bell, D., J. W. Young, and J. Banchereau. (1999). Dendritic cells. *Adv Immunol* 72:255.
- Belz, G. T., G. M. Behrens, C. M. Smith, J. F. Miller, C. Jones, K. Lejon, C. G. Fathman, S. N. Mueller, K. Shortman, F. R. Carbone, and W. R. Heath. (2002). The CD8alpha(+) dendritic cell is responsible for inducing peripheral self-tolerance to tissue-associated antigens. *J Exp Med* 196:1099.
- Bendriss-Vermare, N., C. Barthelemy, I. Durand, C. Bruand, C. Dezutter-Dambuyant, N. Moulian, S. Berrih-Aknin, C. Caux, G. Trinchieri, and F. Briere. (2001). Human thymus contains IFN-alpha-producing CD11c(-), myeloid CD11c(+), and mature interdigitating dendritic cells. *J Clin Invest* 107:835.
- Berard, F., P. Blanco, J. Davoust, E. M. Neidhart-Berard, M. Nouri-Shirazi, N. Taquet, D. Rimoldi, J. C. Cerottini, J. Banchereau, A. K. Palucka, (2000). Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells. *J Exp Med* 192:1535-44.
- Bertho, N., B. Drenou, B. Laupeze, C. L. Berre, L. Amiot, J. M. Grosset, O. Fardel, D. Charron, N. Mooney, and R. Fauchet. (2000). HLA-DR-mediated apoptosis susceptibility discriminates differentiation stages of dendritic/monocytic APC. *J Immunol* 164:2379.
- Bevan, M. J. (1976). Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med* 143:1283.
- Biron, C. A. (2001). Interferons alpha and beta as immune regulators--a new look. *Immunity* 14:661.
- Bjorck, P. (2001). Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice. *Blood* 98:3520.
- Blanco, P., A. K. Palucka, M. Gill, V. Pascual, and J. Banchereau. (2001). Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. *Science* 294:1540.
- Blom, B., S. Ho, S. Antonenko, and Y. J. Liu. (2000). Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 192:1785.
- Blom, B., S. J. Ligthart, R. Schotte, and H. Spits. (2002). Developmental origin of pre-DC2. *Hum Immunol* 63:1072.
- Boes, M., J. Cerny, R. Massol, M. Op den Brouw, T. Kirchhausen, J. Chen, and H. L. Ploegh. (2002). T-cell engagement of dendritic cells rapidly rearranges MHC class II transport. *Nature* 418:983.

- Boise, L. H., A. J. Minn, P. J. Noel, C. H. June, M. A. Accavitti, T. Lindsten, and C. B. Thompson. (1995). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 3:87.
- Boonstra, A., C. Asselin-Paturel, M. Gilliet, C. Crain, G. Trinchieri, Y. J. Liu, and A. O'Garra. (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.
- Borkowski, T. A., J. J. Letterio, A. G. Farr, and M. C. Udey. (1996). A role for endogenous transforming growth factor beta 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor beta 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 184:2417.
- Bouneaud, C., P. Kourilsky, and P. Bousso. (2000). Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity* 13:829.
- Bradley, L. M., D. K. Dalton, and M. Croft. (1996). A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development. *J Immunol* 157:1350.
- Brenan, M., and M. Puklavec. (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.
- Brenan, M., and D. J. Rees. (1997). Sequence analysis of rat integrin alpha E1 and alpha E2 subunits: tissue expression reveals phenotypic similarities between intraepithelial lymphocytes and dendritic cells in lymph. *Eur J Immunol* 27:3070.
- Brocker, T., M. Riedinger, and K. Karjalainen. (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.
- Buelens, C., V. Verhasselt, D. De Groote, K. Thielemans, M. Goldman, and F. Willems. (1997). Human dendritic cell responses to lipopolysaccharide and CD40 ligation are differentially regulated by interleukin-10. *Eur J Immunol* 27:1848.
- Burdin, N., and M. Kronenberg. (1999). CD1-mediated immune responses to glycolipids. *Curr Opin Immunol* 11:326.
- Burnet, F. 1959. *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity*, London.
- Butz, E. A., and M. J. Bevan. (1998). Differential presentation of the same MHC class I epitopes by fibroblasts and dendritic cells. *J Immunol* 160:2139.
- 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.
- Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, I. Durand, M. Cella, A. Lanzavecchia, and J. Banchereau. (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.
- Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, C. Van Kooten, I. Durand, and J. Banchereau. (1994). Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 180:1263.

- Caux, C., B. Vanbervliet, C. Massacrier, C. Dezutter-Dambuyant, B. de Saint-Vis, C. Jacquet, K. Yoneda, S. Imamura, D. Schmitt, and J. Banchereau. (1996). 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.
- Cella, M., A. Engering, V. Pinet, J. Pieters, and A. Lanzavecchia. (1997). Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388:782.
- Cella, M., F. Facchetti, A. Lanzavecchia, and M. Colonna. (2000). Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol* 1:305.
- Cella, M., D. Jarrossay, F. Facchetti, O. Alebardi, H. Nakajima, A. Lanzavecchia, and M. Colonna. (1999a). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 5:919.
- Cella, M., M. Salio, Y. Sakakibara, H. Langen, I. Julkunen, and A. Lanzavecchia. (1999b). Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J Exp Med* 189:821.
- Cella, M., D. Scheidegger, K. Palmer-Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia, and G. Alber. (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.
- Chiffolleau, E., G. Beriou, P. Dutartre, C. Usal, J. P. Soulillou, and M. C. Cuturi. (2002). Role for thymic and splenic regulatory CD4+ T cells induced by donor dendritic cells in allograft tolerance by LF15-0195 treatment. *J Immunol* 168:5058.
- Chomarat, P., J. Banchereau, J. Davoust, and A. K. Palucka. (2000). IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol* 1:510.
- Chuang, T., and R. J. Ulevitch. (2001). Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim Biophys Acta* 1518:157.
- Colonna, M., J. Samaridis, and L. Angman. (2000). Molecular characterization of two novel C-type lectin-like receptors, one of which is selectively expressed in human dendritic cells. *Eur J Immunol* 30:697.
- Cresswell, P. (1996). Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* 84:505.
- da Silva Correia, J., K. Soldau, U. Christen, P. S. Tobias, and R. J. Ulevitch. (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.
- Dalod, M., T. P. Salazar-Mather, L. Malmgaard, C. Lewis, C. Asselin-Paturel, F. Briere, G. Trinchieri, and C. A. Biron. (2002). Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. *J Exp Med* 195:517.
- de Jong, E. C., P. L. Vieira, P. Kalinski, J. H. Schuitemaker, Y. Tanaka, E. A. Wierenga, M. Yazdanbakhsh, and M. L. Kapsenberg. (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.
- de Saint-Vis, B., J. Vincent, S. Vandenabeele, B. Vanbervliet, J. J. Pin, S. Ait-Yahia, S. Patel, M. G. Mattei, J. Banchereau, S. Zurawski, J. Davoust, C. Caux, and S. Lebecque. (1998). A novel lysosome-

associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity* 9:325.

De Smedt, T., B. Pajak, E. Muraille, L. Lespagnard, E. Heinen, P. De Baetselier, J. Urbain, O. Leo, and M. Moser. (1996). Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J Exp Med* 184:1413.

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

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

den Haan, J. M., S. M. Lehar, and M. J. Bevan. (2000). CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* 192:1685.

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

Dieu, M. C., B. Vanbervliet, A. Vicari, J. M. Bridon, E. Oldham, S. Ait-Yahia, F. Briere, A. Zlotnik, S. Lebecque, and C. Caux. (1998). Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 188:373.

Drickamer, K. (1999). C-type lectin-like domains. *Curr Opin Struct Biol* 9:585.

Dzionek, A., Y. Sohma, J. Nagafune, M. Cella, M. Colonna, F. Facchetti, G. Gunther, I. Johnston, A. Lanzavecchia, T. Nagasaka, T. Okada, W. Vermi, G. Winkels, T. Yamamoto, M. Zysk, Y. Yamaguchi, and J. Schmitz. (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.

Edwards, A. D., S. S. Diebold, E. M. Slack, H. Tomizawa, H. Hemmi, T. Kaisho, S. Akira, and C. R. Sousa. (2003). Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *Eur J Immunol* 33:827.

Edwards, A. D., S. P. Manickasingham, R. Sporri, S. S. Diebold, O. Schulz, A. Sher, T. Kaisho, S. Akira, and C. Reis e Sousa. (2002). Microbial recognition via Toll-like receptor-dependent and -independent pathways determines the cytokine response of murine dendritic cell subsets to CD40 triggering. *J Immunol* 169:3652.

Eisenbarth, S. C., D. A. Piggott, J. W. Huleatt, I. Visintin, C. A. Herrick, and K. Bottomly. (2002). Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med* 196:1645.

Elgert, K. D., D. G. Alleva, and D. W. Mullins. (1998). Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. *J Leukoc Biol* 64:275.

Esposito-Farese, M. E., C. Sautes, H. de la Salle, S. Latour, T. Bieber, C. de la Salle, P. Ohlmann, W. H. Fridman, J. P. Cazenave, J. L. Teillaud, and et al. (1995). Membrane and soluble Fc gamma RII/III modulate the antigen-presenting capacity of murine dendritic epidermal Langerhans cells for IgG-complexed antigens. *J Immunol* 155:1725.

Fairchild, P. J., and J. M. Austyn. (1990). Thymic dendritic cells: phenotype and function. *Int Rev Immunol* 6:187.

- Fanger, N. A., C. R. Maliszewski, K. Schooley, and T. S. Griffith. (1999). Human Dendritic Cells Mediate Cellular Apoptosis via Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL). *J Exp Med* 190:1155.
- Fanger, N. A., K. Wardwell, L. Shen, T. F. Tedder, and P. M. Guyre. (1996). Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J Immunol* 157:541.
- Ferrero, I., W. Held, A. Wilson, F. Tacchini-Cottier, F. Radtke, and H. R. MacDonald. (2002). Mouse CD11c(+) B220(+) Gr1(+) plasmacytoid dendritic cells develop independently of the T-cell lineage. *Blood* 100:2852.
- Figdor, C. G., Y. van Kooyk, and G. J. Adema. (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol* 2:77.
- Forster, I., and I. Lieberam. (1996). Peripheral tolerance of CD4 T cells following local activation in adolescent mice. *Eur J Immunol* 26:3194.
- Fournie, G. J., B. Cautain, E. Xystrakis, J. Damoiseaux, M. Mas, D. Lagrange, I. Bernard, J. F. Subra, L. Pelletier, P. Druet, and A. Saoudi. (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 diseases. *Immunol Rev* 184:145.
- Frauwirth, K. A., M. L. Alegre, and C. B. Thompson. (2000). Induction of T cell anergy in the absence of CTLA-4/B7 interaction. *J Immunol* 164:2987.
- Freeman, G. J., A. J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L. J. Fitz, N. Malenkovich, T. Okazaki, M. C. Byrne, H. F. Horton, L. Fouser, L. Carter, V. Ling, M. R. Bowman, B. M. Carreno, M. Collins, C. R. Wood, and T. Honjo. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192:1027.
- Gallucci, S., M. Lolkema, and P. Matzinger. (1999). Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* 5:1249.
- Galy, A., M. Travis, D. Cen, and B. Chen. (1995). Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* 3:459.
- Geijtenbeek, T. B., R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, G. J. Adema, Y. van Kooyk, and C. G. Figdor. (2000). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100:575.
- Geijtenbeek, T., D. S B.Kwon, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, J. Middel, I. L. Cornelissen, H. S. Nottet, V. N. KewalRamani, D. R. Littman, C. G. Figdor, , Y van Kooyk. (2000). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100:587
- Geissmann, F., P. Revy, A. Regnault, Y. Lepelletier, M. Dy, N. Brousse, S. Amigorena, O. Hermine, and A. Durandy. (1999). TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J Immunol* 162:4567.
- Gilliet, M., A. Boonstra, C. Paturel, S. Antonenko, X. L. Xu, G. Trinchieri, A. O'Garra, and Y. J. Liu. (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.

- 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.
- Granucci, F., D. M. Andrews, M. A. Degli-Esposti, and P. Ricciardi-Castagnoli. (2002). IL-2 mediates adjuvant effect of dendritic cells. *Trends Immunol* 23:169.
- Grouard, G., I. Durand, L. Filgueira, J. Banchereau, and Y. J. Liu. (1996). Dendritic cells capable of stimulating T cells in germinal centres. *Nature* 384:364.
- Grouard, G., M. C. Rissoan, L. Filgueira, I. Durand, J. Banchereau, and Y. J. Liu. (1997). The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 185:1101.
- Gunn, M. D., K. Tangemann, C. Tam, J. G. Cyster, S. D. Rosen, and L. T. Williams. (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.
- Hacker, C., R. D. Kirsch, X. S. Ju, T. Hieronymus, T. C. Gust, C. Kuhl, T. Jorgas, S. M. Kurz, S. Rose-John, Y. Yokota, and M. Zenke. (2003). Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development. *Nat Immunol* 4:380.
- Hart, D. N. (1997). Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90:3245.
- Hart, D. N., and J. W. Fabre. (1981). Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain. *J Exp Med* 154:347.
- Hashimoto, C., K. L. Hudson, and K. V. Anderson. (1988). The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52:269.
- Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill, and A. Aderem. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410:1099.
- Heath, W. R., and F. R. Carbone. (2001). Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol* 1:126.
- Hedengren, M., B. Asling, M. S. Dushay, I. Ando, S. Ekengren, M. Wihlborg, and D. Hultmark. (1999). Relish, a central factor in the control of humoral but not cellular immunity in Drosophila. *Mol Cell* 4:827.
- Hemmi, H., T. Kaisho, O. Takeuchi, S. Sato, H. Sanjo, K. Hoshino, T. Horiuchi, H. Tomizawa, K. Takeda, and S. Akira. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88- dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 3:196.
- Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, and S. Akira. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408:740.
- Henri, S., D. Vremec, A. Kamath, J. Waithman, S. Williams, C. Benoist, K. Burnham, S. Saeland, E. Handman, and K. Shortman. (2001). The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *J Immunol* 167:741.

- Hilkens, C. M., A. Snijders, H. Vermeulen, P. H. van der Meide, E. A. Wierenga, and M. L. Kapsenberg. (1996). Accessory cell-derived IL-12 and prostaglandin E2 determine the IFN- $\gamma$  level of activated human CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 156:1722.
- Hochrein, H., M. O'Keeffe, T. Luft, S. Vandenabeele, R. J. Grumont, E. Maraskovsky, and K. Shortman. (2000). Interleukin (IL)-4 is a major regulatory cytokine governing bioactive IL-12 production by mouse and human dendritic cells. *J Exp Med* 192:823.
- Hochrein, H., M. O'Keeffe, and H. Wagner. (2002). Human and mouse plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol* 63:1103.
- Hochrein, H., K. Shortman, D. Vremec, B. Scott, P. Hertzog, and M. O'Keeffe. (2001). Differential production of IL-12, IFN- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  by mouse dendritic cell subsets. *J Immunol* 166:5448.
- Hohl, L., C.Zelle-Rieser, H. Gander, C. Papesh, R. Ramoner, G. Bartsch, H. Rogatsch, A. L. Barsoum, J. H., Jr. Coggin, M. Thurnher, (2002). Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells. *Clin Cancer Res* 8:3369-76.
- Hope, J. C., P. Sopp, R. A. Collins, and C. J. Howard. (2001). Differences in the induction of CD8<sup>+</sup> T cell responses by subpopulations of dendritic cells from afferent lymph are related to IL-1  $\alpha$  secretion. *J Leukoc Biol* 69:271.
- Huang, F. P., N. Platt, M. Wykes, J. R. Major, T. J. Powell, C. D. Jenkins, and G. G. MacPherson. (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.
- Huang, L. Y., C. Reis e Sousa, Y. Itoh, J. Inman, and D. E. Scott. (2001). IL-12 induction by a TH1-inducing adjuvant in vivo: dendritic cell subsets and regulation by IL-10. *J Immunol* 167:1423.
- Huang, X., Z. Yuan, G. Chen, M. Zhang, W. Zhang, Y. Yu, and X. Cao. (2001). Cloning and characterization of a novel ITIM containing lectin-like immunoreceptor LLIR and its two transmembrane region deletion variants. *Biochem Biophys Res Commun* 281:131.
- Hugo, P., J. W. Kappler, D. I. Godfrey, and P. C. Marrack. (1994). Thymic epithelial cell lines that mediate positive selection can also induce thymocyte clonal deletion. *J Immunol* 152:1022.
- Iezzi, G., K. Karjalainen, and A. Lanzavecchia. (1998). The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* 8:89.
- Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, and R. M. Steinman. (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.
- Inaba, K., J. P. Metlay, M. T. Crowley, and R. M. Steinman. (1990). Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ [published erratum appears in *J Exp Med* 1990 Oct 1;172(4):1275]. *J Exp Med* 172:631.
- Inaba, K., M. Pack, M. Inaba, H. Sakuta, F. Isdell, and R. M. Steinman. (1997). High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *J Exp Med* 186:665.
- Inaba, K., S. Turley, F. Yamaide, T. Iyoda, K. Mahnke, M. Inaba, M. Pack, M. Subklewe, B. Sauter, D. Sheff, M. Albert, N. Bhardwaj, I. Mellman, and R. M. Steinman. (1998). Efficient presentation of



phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J Exp Med* 188:2163.

Inaba, K., M. Witmer Pack, M. Inaba, K. S. Hathcock, H. Sakuta, M. Azuma, H. Yagita, K. Okumura, P. S. Linsley, S. Ikehara, and 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.

Ingulli, E., A. Mondino, A. Khoruts, and M. K. Jenkins. (1997). In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4(+) T cells. *J Exp Med* 185:2133.

Isaacs, A., and J. Lindenmann. (1987). Virus interference. I. The interferon. By A. Isaacs and J. Lindenmann, 1957. *J Interferon Res* 7:429.

Ito, T., R. Amakawa, T. Kaisho, H. Hemmi, K. Tajima, K. Uehira, Y. Ozaki, H. Tomizawa, S. Akira, and S. Fukuhara. (2002). Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J Exp Med* 195:1507.

Iwasaki, A., and B. L. Kelsall. (1999). Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp Med* 190:229.

Iwasaki, A., and B. L. Kelsall. (2000). Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine. *J Exp Med* 191:1381.

Iwasaki, A., and B. L. Kelsall. (2001). Unique functions of CD11b+, CD8 alpha+, and double-negative Peyer's patch dendritic cells. *J Immunol* 166:4884.

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

Jahnsen, F. L., E. D. Moloney, T. Hogan, J. W. Upham, C. M. Burke, and P. G. Holt. (2001). Rapid dendritic cell recruitment to the bronchial mucosa of patients with atopic asthma in response to local allergen challenge. *Thorax* 56:823.

Janjic, B. M., G. Lu, A. Pimenov, T. L. Whiteside, W. J. Storkus, and N. L. Vujanovic. (2002). Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. I. Involvement of an apoptosis-inducing pathway. *J Immunol* 168:1823.

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

Jenne, L., J. F. Arrighi, H. Jonuleit, J. H. Saurat, C Hauser, (2000). Dendritic cells containing apoptotic melanoma cells prime human CD8+ T cells for efficient tumor cell lysis. *Cancer Res* 60:4446.

Jiang, Q., S. Akashi, K. Miyake, and H. R. Petty. (2000). Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll- like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B. *J Immunol* 165:3541.

Jiang, S., S. Tugulea, G. Pennesi, Z. Liu, A. Mulder, S. Lederman, P. Harris, R. Cortesini, and N. Suci-Foca. (1998). Induction of MHC-class I restricted human suppressor T cells by peptide priming in vitro. *Hum Immunol* 59:690.

- Jonuleit, H., E. Schmitt, G. Schuler, J. Knop, and A. H. Enk. (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.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, K. Steinbrink, and A. H. Enk. (2001). Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol* 22:394.
- Josien, R., M. Heslan, S. Brouard, J. P. Soulillou, and M. C. Cuturi. (1998). Critical requirement for graft passenger leukocytes in allograft tolerance induced by donor blood transfusion. *Blood* 92:4539.
- Josien, R., M. Heslan, J. P. Soulillou, and M. C. Cuturi. (1997). Rat spleen dendritic cells express natural killer cell receptor protein 1 (NKR-P1) and have cytotoxic activity to select targets via a Ca<sup>2+</sup>-dependent mechanism. *J Exp Med* 186:467.
- Josien, R., B. R. Wong, H. L. Li, R. M. Steinman, and Y. Choi. (1999). TRANCE, a TNF Family Member, Is Differentially Expressed on T Cell Subsets and Induces Cytokine Production in Dendritic Cells. *J Immunol* 162:2562.
- Jurk, M., F. Heil, J. Vollmer, C. Schetter, A. M. Krieg, H. Wagner, G. Lipford, and S. Bauer. (2002). Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* 3:499.
- Kadowaki, N., S. Antonenko, J. Y. Lau, and Y. J. Liu. (2000). Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 192:219.
- Kadowaki, N., S. Antonenko, and Y. J. Liu. (2001a). Distinct CpG DNA and polyinosinic-polycytidylic acid double-stranded RNA, respectively, stimulate CD11c- type 2 dendritic cell precursors and CD11c+ dendritic cells to produce type I IFN. *J Immunol* 166:2291.
- Kadowaki, N., S. Ho, S. Antonenko, R. W. Malefyt, R. A. Kastelein, F. Bazan, and Y. J. Liu. (2001b). Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 194:863.
- Kadowaki, N., and Y. J. Liu. (2002). Natural type I interferon-producing cells as a link between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol* 63:1126.
- Kaisho, T., and S. Akira. (2002). Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim Biophys Acta* 1589:1.
- Kalinski, P., C. M. Hilkens, E. A. Wierenga, and M. L. Kapsenberg. (1999). T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 20:561.
- Kamath, A. T., J. Pooley, M. A. O'Keeffe, D. Vremec, Y. Zhan, A. M. Lew, A. D'Amico, L. Wu, D. F. Tough, and K. Shortman. (2000). The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations. *J Immunol* 165:6762.
- Kato, M., T. K. Neil, D. B. Fearnley, A. D. McLellan, S. Vuckovic, and D. N. Hart. (2000). Expression of multilectin receptors and comparative FITC-dextran uptake by human dendritic cells. *Int Immunol* 12:1511.
- Kitamura, H., K. Iwakabe, T. Yahata, S. Nishimura, A. Ohta, Y. Ohmi, M. Sato, K. Takeda, K. Okumura, L. Van Kaer, T. Kawano, M. Taniguchi, and T. Nishimura. (1999). The natural killer T (NKT) cell ligand alpha-galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)- 12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. *J Exp Med* 189:1121.

- Kleindienst, P., and T. Brocker. (2003). Endogenous dendritic cells are required for amplification of T cell responses induced by dendritic cell vaccines in vivo. *J Immunol* 170:2817.
- Kovacsovics-Bankowski, M., K. Clark, B. Benacerraf, and K. L. Rock. (1993). Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:4942.
- Kronin, V., C. J. Fitzmaurice, I. Caminschi, K. Shortman, D. C. Jackson, and L. E. Brown. (2001). Differential effect of CD8(+) and CD8(-) dendritic cells in the stimulation of secondary CD4(+) T cells. *Int Immunol* 13:465.
- Kronin, V., H. Hochrein, K. Shortman, and A. Kelso. (2000). Regulation of T cell cytokine production by dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 78:214.
- Kronin, V., K. Winkel, G. Suss, A. Kelso, W. Heath, J. Kirberg, H. von Boehmer, and K. Shortman. (1996). A subclass of dendritic cells regulates the response of naive CD8 T cells by limiting their IL-2 production. *J Immunol* 157:3819.
- Krug, A., A. Towarowski, S. Britsch, S. Rothenfusser, V. Hornung, R. Bals, T. Giese, H. Engelmann, S. Endres, A. M. Krieg, and G. Hartmann. (2001). 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.
- Krug, A., R. Veeraswamy, A. Pekosz, O. Kanagawa, E. R. Unanue, M. Colonna, and M. Cella. (2003). Interferon-producing Cells Fail to Induce Proliferation of Naive T Cells but Can Promote Expansion and T Helper 1 Differentiation of Antigen-experienced Unpolarized T Cells. *J Exp Med* 197:899.
- Kurt-Jones, E. A., L. Popova, L. Kwinn, L. M. Haynes, L. P. Jones, R. A. Tripp, E. E. Walsh, M. W. Freeman, D. T. Golenbock, L. J. Anderson, and R. W. Finberg. (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 1:398.
- Kurts, C., W. R. Heath, F. R. Carbone, J. Allison, J. F. Miller, and H. Kosaka. (1996). Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J Exp Med* 184:923.
- Kuwana, M., J. Kaburaki, T. M. Wright, Y. Kawakami, and Y. Ikeda. (2001). Induction of antigen-specific human CD4(+) T cell anergy by peripheral blood DC2 precursors. *Eur J Immunol* 31:2547.
- Landmann, S., A. Muhlethaler-Mottet, L. Bernasconi, T. Suter, J. M. Waldburger, K. Masternak, J. F. Arrighi, C. Hauser, A. Fontana, and W. Reith. (2001). Maturation of dendritic cells is accompanied by rapid transcriptional silencing of class II transactivator (CIITA) expression. *J Exp Med* 194:379.
- Lane, P. (2000). Role of OX40 signals in coordinating CD4 T cell selection, migration, and cytokine differentiation in T helper (Th)1 and Th2 cells. *J Exp Med* 191:201.
- Langenkamp, A., M. Messi, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. (2000). Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol* 1:311.
- Le Gros, G., S. Z. Ben-Sasson, D. H. Conrad, I. Clark-Lewis, F. D. Finkelman, M. Plaut, and W. E. Paul. (1990). IL-3 promotes production of IL-4 by splenic non-B, non-T cells in response to Fc receptor cross-linkage. *J Immunol* 145:2500.
- Le Gros, G., and F. Erard. (1994). Non-cytotoxic, IL-4, IL-5, IL-10 producing CD8+ T cells: their activation and effector functions. *Curr Opin Immunol* 6:453.

- Legge, K. L., R. K. Gregg, R. Maldonado-Lopez, L. Li, J. C. Caprio, M. Moser, and H. Zaghouani. (2002). On the role of dendritic cells in peripheral T cell tolerance and modulation of autoimmunity. *J Exp Med* 196:217.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, and J. A. Hoffmann. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973.
- Levings, M. K., R. Sangregorio, F. Galbiati, S. Squadrone, R. de Waal Malefyt, and M. G. Roncarolo. (2001). IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J Immunol* 166:5530.
- Linsley, P. S., J. L. Greene, P. Tan, J. Bradshaw, J. A. Ledbetter, C. Anasetti, and N. K. Damle. (1992). Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J Exp Med* 176:1595.
- Liu, L., M. Zhang, C. Jenkins, and G. G. MacPherson. (1998). Dendritic cell heterogeneity in vivo: two functionally different dendritic cell populations in rat intestinal lymph can be distinguished by CD4 expression. *J Immunol* 161:1146.
- Liu, L. M., and G. G. MacPherson. (1995). Rat intestinal dendritic cells: immunostimulatory potency and phenotypic characterization. *Immunology* 85:88.
- Liu, S., Y. Yu, M. Zhang, W. Wang, and X. Cao. (2001). The involvement of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand in the enhanced cytotoxicity of IFN-beta-stimulated human dendritic cells to tumor cells. *J Immunol* 166:5407.
- Liu, T., T. Matsuguchi, N. Tsuboi, T. Yajima, and Y. Yoshikai. (2002). Differences in expression of toll-like receptors and their reactivities in dendritic cells in BALB/c and C57BL/6 mice. *Infect Immun* 70:6638.
- Liu, Y. J. (2001). Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* 106:259.
- Liu, Y. J., H. Kanzler, V. Soumelis, and M. Gilliet. (2001). Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat Immunol* 2:585.
- Lore, K., A. Sonnerborg, A. L. Spetz, U. Andersson, and J. Andersson. (1998). Immunocytochemical detection of cytokines and chemokines in Langerhans cells and in vitro derived dendritic cells. *J Immunol Methods* 214:97.
- Lu, L., X. Liang, W. Li, Z. Chen, M. Nalesnick, C. Bonham, J. Fung, and S. Qian. (2001). A novel subset of dendritic cells propagated from the liver promotes differentiation of T regulatory cells and enhances allograft survival. *Transplant Proc* 33:229.
- Lu, L., S. Qian, P. A. Hershberger, W. A. Rudert, D. H. Lynch, and A. W. Thomson. (1997). Fas ligand (CD95L) and B7 expression on dendritic cells provide counter-regulatory signals for T cell survival and proliferation. *J Immunol* 158:5676.
- Lu, Z., L. Yuan, X. Zhou, E. Sotomayor, H. I. Levitsky, and D. M. Pardoll. (2000). CD40-independent pathways of T cell help for priming of CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 191:541.
- Lucas, P. J., I. Negishi, K. Nakayama, L. E. Fields, and D. Y. Loh. (1995). Naive CD28-deficient T cells can initiate but not sustain an in vitro antigen-specific immune response. *J Immunol* 154:5757.

- Lutz, M. B., and G. Schuler. (2002). Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 23:445.
- MacPherson, G. G., C. D. Jenkins, M. J. Stein, and C. Edwards. (1995). Endotoxin-mediated dendritic cell release from the intestine. Characterization of released dendritic cells and TNF dependence. *J Immunol* 154:1317.
- Mahnke, K., M. Guo, S. Lee, H. Sepulveda, S. L. Swain, M. Nussenzweig, and R. M. Steinman. (2000). The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J Cell Biol* 151:673.
- Maldonado-Lopez, R., T. De Smedt, P. Michel, J. Godfroid, B. Pajak, C. Heirman, K. Thielemans, O. Leo, J. Urbain, and M. Moser. (1999). CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med* 189:587.
- Martin, P., S. R. Ruiz, G. M. del Hoyo, F. Anjuere, H. H. Vargas, M. Lopez-Bravo, and C. Ardavin. (2002). Dramatic increase in lymph node dendritic cell number during infection by the mouse mammary tumor virus occurs by a CD62L-dependent blood-borne DC recruitment. *Blood* 99:1282.
- Mathiasen, I. S., and M. Jaattela. (2002). Triggering caspase-independent cell death to combat cancer. *Trends Mol Med* 8:212.
- Matsuguchi, T., K. Takagi, T. Musikacharoen, and Y. Yoshikai. (2000). Gene expressions of lipopolysaccharide receptors, toll-like receptors 2 and 4, are differently regulated in mouse T lymphocytes. *Blood* 95:1378.
- Matsuno, K., and T. Ezaki. (2000). Dendritic cell dynamics in the liver and hepatic lymph. *Int Rev Cytol* 197:83.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, Danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* 12:991.
- Maurer, D., C. Ebner, B. Reininger, E. Fiebiger, D. Kraft, J. P. Kinet, and G. Stingl. (1995). The high affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) mediates IgE-dependent allergen presentation. *J Immunol* 154:6285.
- McGuirk, P., C. McCann, and K. H. Mills. (2002). Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. *J Exp Med* 195:221.
- McIlroy, D., B. Autran, R. Cheynier, S. Wain-Hobson, J. P. Clauvel, E. Oksenhendler, P. Debre, and A. Hosmalin. (1995). Infection frequency of dendritic cells and CD4+ T lymphocytes in spleens of human immunodeficiency virus-positive patients. *J Virol* 69:4737.
- McLellan, A. D., M. Kapp, A. Eggert, C. Linden, U. Bommhardt, E. B. Brocker, U. Kammerer, and E. Kampgen. (2002). Anatomic location and T-cell stimulatory functions of mouse dendritic cell subsets defined by CD4 and CD8 expression. *Blood* 99:2084.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway, Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394.
- Mellman, I., and R. M. Steinman. (2001). Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106:255.

- Menges, M., S. Rossner, C. Voigtlander, H. Schindler, N. A. Kukutsch, C. Bogdan, K. Erb, G. Schuler, and M. B. Lutz. (2002). Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J Exp Med* 195:15.
- Merad, M., M. G. Manz, H. Karsunky, A. Wagers, W. Peters, I. Charo, I. L. Weissman, J. G. Cyster, and E. G. Engleman. (2002). Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol* 3:1135.
- Michelsen, K. S., A. Aicher, M. Mohaupt, T. Hartung, S. Dimmeler, C. J. Kirschning, and R. R. Schumann. (2001). The role of toll-like receptors (TLRs) in bacteria-induced maturation of murine dendritic cells (DCs). Peptidoglycan and lipoteichoic acid are inducers of DC maturation and require TLR2. *J Biol Chem* 276:25680.
- Millonig, G., H. Niederegger, W. Rabl, B. W. Hochleitner, D. Hofer, N. Romani, and G. Wick. (2001). Network of vascular-associated dendritic cells in intima of healthy young individuals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:503.
- Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin, and R. L. Coffman. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136:2348.
- Mosmann, T. R., J. H. Schumacher, D. F. Fiorentino, J. Leverah, K. W. Moore, and M. W. Bond. (1990). Isolation of monoclonal antibodies specific for IL-4, IL-5, IL-6, and a new Th2-specific cytokine (IL-10), cytokine synthesis inhibitory factor, by using a solid phase radioimmunoabsorbent assay. *J Immunol* 145:2938.
- Mueller, C. G., M. C. Rissoan, B. Salinas, S. Ait-Yahia, O. Ravel, J. M. Bridon, F. Briere, S. Lebecque, and Y. J. Liu. (1997). Polymerase chain reaction selects a novel disintegrin proteinase from CD40-activated germinal center dendritic cells. *J Exp Med* 186:655.
- Muzio, M., and A. Mantovani. (2001). Toll-like receptors (TLRs) signalling and expression pattern. *J Endotoxin Res* 7:297.
- Naik, S., D. Vremec, L. Wu, M. O'Keeffe, and K. Shortman. (2003). CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> mouse spleen dendritic cells do not originate from the CD8<sup>-</sup> dendritic cell subset. *Blood*.
- Nagata, Y., S. Ono, M. Matsuo, S. Gnjatic, D. Valmori, G. Ritter, W. Garrett, L. J. Old, I. Mellman. (2002). Differential presentation of a soluble exogenous tumor antigen, NY-ESO-1, by distinct human dendritic cell populations. *P.N.A.S.* 99:10629.
- Nakano, H., M. Yanagita, and M. D. Gunn. (2001). CD11c<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 194:1171.
- Nestle, F. O. (2000). Dendritic cell vaccination for cancer therapy. *Oncogene* 19:6673.
- Nijman, H. W., M. J. Kleijmeer, M. A. Ossevoort, V. M. Oorschot, M. P. Vierboom, M. van de Keur, P. Kenemans, W. M. Kast, H. J. Geuze, and C. J. Melief. (1995). Antigen capture and major histocompatibility class II compartments of freshly isolated and cultured human blood dendritic cells. *J Exp Med* 182:163.
- Noble, A., P. A. Macary, and D. M. Kemeny. (1995). IFN-gamma and IL-4 regulate the growth and differentiation of CD8<sup>+</sup> T cells into subpopulations with distinct cytokine profiles. *J Immunol* 155:2928.

- Noble, A., Z. S. Zhao, and H. Cantor. (1998). Suppression of immune responses by CD8 cells. II. Qa-1 on activated B cells stimulates CD8 cell suppression of T helper 2 responses. *J Immunol* 160:566.
- Nomura, F., S. Akashi, Y. Sakao, S. Sato, T. Kawai, M. Matsumoto, K. Nakanishi, M. Kimoto, K. Miyake, K. Takeda, and S. Akira. (2000). Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* 164:3476.
- O'Connell, P. J., W. Li, Z. Wang, S. M. Specht, A. J. Logar, and A. W. Thomson. (2002). Immature and mature CD8alpha+ dendritic cells prolong the survival of vascularized heart allografts. *J Immunol* 168:143.
- O'Doherty, U., M. Peng, S. Gezelter, W. J. Swiggard, M. Betjes, N. Bhardwaj, and R. M. Steinman. (1994). Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 82:487.
- O'Garra, A., N. Hosken, S. Macatonia, C. A. Wenner, and K. Murphy. (1995). The role of macrophage- and dendritic cell-derived IL12 in Th1 phenotype development. *Res Immunol* 146:466.
- Ohashi, K., V. Burkart, S. Flohe, and H. Kolb. (2000). Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 164:558.
- Ohshima, Y., Y. Tanaka, H. Tozawa, Y. Takahashi, C. Maliszewski, and G. Delespesse. (1997). Expression and function of OX40 ligand on human dendritic cells. *J Immunol* 159:3838.
- O'Keeffe, M., H. Hochrein, D. Vremec, I. Caminschi, J. L. Miller, E. M. Anders, L. Wu, M. H. Lahoud, S. Henri, B. Scott, P. Hertzog, L. Tatarczuch, and K. Shortman. (2002a). 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.
- O'Keeffe, M., H. Hochrein, D. Vremec, J. Pooley, R. Evans, S. Woulfe, and K. Shortman. (2002b). Effects of administration of progenipointin 1, Flt-3 ligand, granulocyte colony-stimulating factor, and pegylated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell subsets in mice. *Blood* 99:2122.
- Olweus, J., A. BitMansour, R. Warnke, P. A. Thompson, J. Carballido, L. J. Picker, and F. Lund-Johansen. (1997). Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12551.
- Oppmann, B., R. Lesley, B. Blom, J. C. Timans, Y. Xu, B. Hunte, F. Vega, N. Yu, J. Wang, K. Singh, F. Zonin, E. Vaisberg, T. Churakova, M. Liu, D. Gorman, J. Wagner, S. Zurawski, Y. Liu, J. S. Abrams, K. W. Moore, D. Rennick, R. de Waal-Malefyt, C. Hannum, J. F. Bazan, and R. A. Kastelein. (2000). Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13:715.
- Ortaldo, J. R., A. Mason, E. Rehberg, J. Moschera, B. Kelder, S. Pestka, and R. B. Herberman. (1983). Effects of recombinant and hybrid recombinant human leukocyte interferons on cytotoxic activity of natural killer cells. *J Biol Chem* 258:15011.
- Pamer, E., and P. Cresswell. (1998). Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* 16:323.
- Pasare, C., and R. Medzhitov. (2003). Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 299:1033.

- Penna, G., M. Vulcano, S. Sozzani, and L. Adorini. (2002). Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol* 63:1164.
- Pfeifer, J. D., M. J. Wick, R. L. Roberts, K. Findlay, S. J. Normark, and C. V. Harding. (1993). Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* 361:359.
- Pierre, P., and I. Mellman. (1998). Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells. *Cell* 93:1135.
- Platt, N., R. P. da Silva, and S. Gordon. (1998). Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol* 8:365.
- Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B. Beutler. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282:2085.
- Pooley, J. L., W. R. Heath, and K. Shortman. (2001). Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells. *J Immunol* 166:5327.
- Porcelli, S. A., and R. L. Modlin. (1999). The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu Rev Immunol* 17:297.
- Proudfoot, A. E. (2002). Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev Immunol* 2:106.
- Pugh, C. W., G. G. MacPherson, and H. W. Steer. (1983). Characterization of nonlymphoid cells derived from rat peripheral lymph. *J Exp Med* 157:1758.
- Pulendran, B., J. Banchereau, S. Burkeholder, E. Kraus, E. Guinet, C. Chalouni, D. Caron, C. Maliszewski, J. Davoust, J. Fay, and K. Palucka. (2000). Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J Immunol* 165:566.
- Pulendran, B., J. Banchereau, E. Maraskovsky, and C. Maliszewski. (2001a). Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. *Trends Immunol* 22:41.
- Pulendran, B., P. Kumar, C. W. Cutler, M. Mohamadzadeh, T. Van Dyke, and J. Banchereau. (2001b). Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *J Immunol* 167:5067.
- Pulendran, B., J. L. Smith, G. Caspary, K. Brasel, D. Pettit, E. Maraskovsky, and C. R. Maliszewski. (1999). Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1036.
- Qureshi, S. T., L. Lariviere, G. Leveque, S. Clermont, K. J. Moore, P. Gros, and D. Malo. (1999). Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med* 189:615.
- Randolph, G. J., S. Beaulieu, S. Lebecque, R. M. Steinman, and W. A. Muller. (1998). Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 282:480.
- Randolph, G. J., K. Inaba, D. F. Robbani, R. M. Steinman, and W. A. Muller. (1999). Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* 11:753.
- Regnault, A., D. Lankar, V. Lacabanne, A. Rodriguez, C. Thery, M. Rescigno, T. Saito, S. Verbeek, C. Bonnerot, P. Ricciardi-Castagnoli, and S. Amigorena. (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.
- Reis e Sousa, C., and R. N. Germain. (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.
- Ren, R., B. J. Mayer, P. Cicchetti, and D. Baltimore. (1993). Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* 259:1157.
- Res, P. C., F. Couwenberg, F. A. Vyth-Dreese, and H. Spits. (1999). Expression of pTalpha mRNA in a committed dendritic cell precursor in the human thymus. *Blood* 94:2647.
- Rescigno, M., F. Granucci, S. Citterio, M. Foti, and P. Ricciardi-Castagnoli. (1999). Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. *Immunol Today* 20:200.
- Rescigno, M., M. Martino, C. L. Sutherland, M. R. Gold, and P. Ricciardi-Castagnoli. (1998). Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J Exp Med* 188:2175.
- Rescigno, M., V. Piguet, B. Valzasina, S. Lens, R. Zubler, L. French, V. Kindler, J. Tschopp, and P. Ricciardi-Castagnoli. (2000). Fas engagement induces the maturation of dendritic cells (DCs), the release of interleukin (IL)-1beta, and the production of interferon gamma in the absence of IL-12 during DC-T cell cognate interaction: a new role for Fas ligand in inflammatory responses. *J Exp Med* 192:1661.
- Ridge, J. P., F. Di Rosa, and P. Matzinger. (1998). A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T- helper and a T-killer cell [see comments]. *Nature* 393:474.
- Rieser, C., G. Bock, H. Klocker, G. Bartsch, and M. Thurnher. (1997). Prostaglandin E2 and tumor necrosis factor alpha cooperate to activate human dendritic cells: synergistic activation of interleukin 12 production. *J Exp Med* 186:1603.
- Rissoan, M. C., V. Soumelis, N. Kadowaki, G. Grouard, F. Briere, R. de Waal Malefyt, and Y. J. Liu. (1999). Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283:1183.
- Robinson, A. P., T. M. White, and D. W. Mason. (1986). Macrophage heterogeneity in the rat as delineated by two monoclonal antibodies MRC OX-41 and MRC OX-42, the latter recognizing complement receptor type 3. *Immunology* 57:239.
- Robinson, S. P., S. Patterson, N. English, D. Davies, S. C. Knight, and C. D. Reid. (1999). Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur J Immunol* 29:2769.
- Romani, N., A. Lenz, H. Glassel, H. Stossel, U. Stanzl, O. Majdic, P. Fritsch, and G. Schuler. (1989). Cultured human Langerhans cells resemble lymphoid dendritic cells in phenotype and function. *J Invest Dermatol* 93:600.
- Romani, N., G. Ratzinger, K. Pfaller, W. Salvenmoser, H. Stossel, F. Koch, and P. Stoitzner. (2001). Migration of dendritic cells into lymphatics-the Langerhans cell example: routes, regulation, and relevance. *Int Rev Cytol* 207:237.
- Romani, N., D. Reider, M. Heuer, S. Ebner, E. Kampgen, B. Eibl, D. Niederwieser, and G. Schuler. (1996). Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* 196:137.

- Rothenfusser, S., E. Tuma, S. Endres, and G. Hartmann. (2002). Plasmacytoid dendritic cells: the key to CpG(1). *Hum Immunol* 63:1111.
- Rovere, P., C. Vallinoto, A. Bondanza, M. C. Crosti, M. Rescigno, P. Ricciardi-Castagnoli, C. Rugarli, and A. A. Manfredi. (1998). Bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigen-presenting function. *J Immunol* 161:4467.
- Rutschmann, S., A. Kilinc, and D. Ferrandon. (2002). Cutting edge: the toll pathway is required for resistance to gram-positive bacterial infections in *Drosophila*. *J Immunol* 168:1542.
- Salgame, P., J. Convit, and B. R. Bloom. (1991). Immunological suppression by human CD8+ T cells is receptor dependent and HLA-DQ restricted. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:2598.
- Salio, M., M. Cella, M. Suter, and A. Lanzavecchia. (1999). Inhibition of dendritic cell maturation by herpes simplex virus. *Eur J Immunol* 29:3245.
- Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, and A. Lanzavecchia. (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.
- Sallusto, F., and A. Lanzavecchia. (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.
- Sallusto, F., P. Schaerli, P. Loetscher, C. Schaniel, D. Lenig, C. R. Mackay, S. Qin, and A. Lanzavecchia. (1998). Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 28:2760.
- Saunders, D., K. Lucas, J. Ismaili, L. Wu, E. Maraskovsky, A. Dunn, and K. Shortman. (1996). Dendritic cell development in culture from thymic precursor cells in the absence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 184:2185.
- Sauter, B., M. L. Albert, L. Francisco, M. Larsson, S. Somersan, and N. Bhardwaj. (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.
- Scheinecker, C., R. McHugh, E. M. Shevach, and R. N. Germain. (2002). Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. *J Exp Med* 196:1079.
- Schlecht, G., C. Leclerc, and G. Dadaglio. (2001). Induction of CTL and nonpolarized Th cell responses by CD8alpha(+) and CD8alpha(-) dendritic cells. *J Immunol* 167:4215.
- Schiavoni, G., F. Mattei, P. Sestili, P. Borghi, M. Venditti, H. C., 3rd Morse, F. Belardelli, L. Gabriele, (2002). ICSBP is essential for the development of mouse type I interferon-producing cells and for the generation and activation of CD8alpha(+) dendritic cells. *J Exp Med* 196:1415
- Schnare, M., G. M. Barton, A. C. Holt, K. Takeda, S. Akira, and R. Medzhitov. (2001). Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2:947.
- Schuler, G., and R. M. Steinman. (1985). Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med* 161:526.
- Schuler, G., B. Schuler-Thurner, R. M Steinman. (2003). The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 1: 138.

- Schulz, O., D. J. Pennington, K. Hodivala-Dilke, M. Febbraio, and C. Reis e Sousa. (2002). CD36 or alphavbeta3 and alphavbeta5 integrins are not essential for MHC class I cross-presentation of cell-associated antigen by CD8 alpha+ murine dendritic cells. *J Immunol* 168:6057.
- Schuurhuis, D. H., S. Laban, R. E. Toes, P. Ricciardi-Castagnoli, M. J. Kleijmeer, E. I. van der Voort, D. Rea, R. Offringa, H. J. Geuze, C. J. Melief, and F. Ossendorp. (2000). Immature dendritic cells acquire CD8(+) cytotoxic T lymphocyte priming capacity upon activation by T helper cell-independent or -dependent stimuli. *J Exp Med* 192:145.
- Schwartz, R. H., D. L. Mueller, M. K. Jenkins, and H. Quill. (1989). T-cell clonal anergy. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 2:605.
- Seki, E., H. Tsutsui, H. Nakano, N. Tsuji, K. Hoshino, O. Adachi, K. Adachi, S. Futatsugi, K. Kuida, O. Takeuchi, H. Okamura, J. Fujimoto, S. Akira, and K. Nakanishi. (2001). Lipopolysaccharide-induced IL-18 secretion from murine Kupffer cells independently of myeloid differentiation factor 88 that is critically involved in induction of production of IL-12 and IL-1beta. *J Immunol* 166:2651.
- Shibaki, A., and S. I. Katz. (2001). Activation through CD40 ligation induces functional Fas ligand expression by Langerhans cells. *Eur J Immunol* 31:3006.
- Shimazu, R., S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome, K. Miyake, and M. Kimoto. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189:1777.
- Shortman, K. (2000). Burnet oration: dendritic cells: multiple subtypes, multiple origins, multiple functions. *Immunol Cell Biol* 78:161.
- Shuford, W. W., K. Klussman, D. D. Tritchler, D. T. Loo, J. Chalupny, A. W. Siadak, T. J. Brown, J. Emswiler, H. Raecho, C. P. Larsen, T. C. Pearson, J. A. Ledbetter, A. Aruffo, and R. S. Mittler. (1997). 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. *J Exp Med* 186:47.
- Siegal, F. P., N. Kadowaki, M. Shodell, P. A. Fitzgerald-Bocarsly, K. Shah, S. Ho, S. Antonenko, and Y. J. Liu. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284:1835.
- Sigal, L. J., and K. L. Rock. (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.
- Slepnev, V. I., and P. De Camilli. (2000). Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat Rev Neurosci* 1:161.
- Soumelis, V., P. A. Reche, H. Kanzler, W. Yuan, G. Edward, B. Homey, M. Gilliet, S. Ho, S. Antonenko, A. Lauerma, K. Smith, D. Gorman, S. Zurawski, J. Abrams, S. Menon, T. McClanahan, R. de Waal-Malefyt Rd, F. Bazan, R. A. Kastelein, and Y. J. Liu. (2002). Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* 3:673.
- Sousa, C. R., S. Hieny, T. Scharon-Kersten, D. Jankovic, H. Charest, R. N. Germain, and A. Sher. (1997). In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas [see comments]. *J Exp Med* 186:1819.

- Spits, H., F. Couwenberg, A. Q. Bakker, K. Weijer, and C. H. Uittenbogaart. (2000). Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2. *J Exp Med* 192:1775.
- Sprent, J., D. Lo, E. K. Gao, and Y. Ron. (1988). T cell selection in the thymus. *Immunol Rev* 101:173.
- Springer, T. A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76:301.
- Staveley-O'Carroll, K., E. Sotomayor, J. Montgomery, I. Borrello, L. Hwang, S. Fein, D. Pardoll, and H. Levitsky. (1998). Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1178.
- Steinbrink, K., H. Jonuleit, G. Muller, G. Schuler, J. Knop, and A. H. Enk. (1999). Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* 93:1634.
- Steinbrink, K., M. Wolfl, H. Jonuleit, J. Knop, and A. H. Enk. (1997). Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 159:4772.
- Steiniger, B., J. Klempnauer, and K. Wonigeit. (1984). Phenotype and histological distribution of interstitial dendritic cells in the rat pancreas, liver, heart, and kidney. *Transplantation* 38:169.
- Steinman, R. M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271.
- Steinman, R. M., J. C. Adams, and Z. A. Cohn. (1975). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. *J Exp Med* 141:804.
- Steinman, R. M., and Z. A. Cohn. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137:1142.
- Steinman, R. M., and K. Inaba. (1999). Myeloid dendritic cells. *J Leukoc Biol* 66:205.
- Steinman, R. M., G. Kaplan, M. D. Witmer, and Z. A. Cohn. (1979). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *J Exp Med* 149:1.
- 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* 99:351.
- Steinman, R. M., M. Pack, and K. Inaba. (1997). Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunol Rev* 156:25.
- Steinman, R. M., S. Turley, I. Mellman, and K. Inaba. (2000). The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 191:411.
- Steitz, J., J. Bruck, J. Lenz, J. Knop, and T. Tuting. (2001). Depletion of CD25(+) CD4(+) T cells and treatment with tyrosinase-related protein 2-transduced dendritic cells enhance the interferon alpha-induced, CD8(+) T-cell-dependent immune defense of B16 melanoma. *Cancer Res* 61:8643.
- Stevens, T. L., A. Bossie, V. M. Sanders, R. Fernandez-Botran, R. L. Coffman, T. R. Mosmann, and E. S. Vitetta. (1988). Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* 334:255.

Streilein, J. W., P. J. Wood, L. W. Lonsberry, and P. R. Bergstresser. (1984). Induction of H-2-restricted contact hypersensitivity by hapten-derivatized skin grafts. Evidence that the immunogenic signal includes H-2 determinants derived from the skin. *Transplantation* 37:195.

Strobl, H., C. Bello-Fernandez, E. Riedl, W. F. Pickl, O. Majdic, S. D. Lyman, and W. Knapp. (1997). flt3 ligand in cooperation with transforming growth factor-beta1 potentiates in vitro development of Langerhans-type dendritic cells and allows single-cell dendritic cell cluster formation under serum-free conditions. *Blood* 90:1425.

Strobl, H., E. Riedl, C. Scheinecker, C. Bello Fernandez, W. F. Pickl, K. Rappersberger, O. Majdic, and W. Knapp. (1996). TGF-beta 1 promotes in vitro development of dendritic cells from CD34+ hemopoietic progenitors. *J Immunol* 157:1499.

Stuber, E., M. Neurath, D. Calderhead, H. P. Fell, and W. Strober. (1995). Cross-linking of OX40 ligand, a member of the TNF/NGF cytokine family, induces proliferation and differentiation in murine splenic B cells. *Immunity* 2:507.

Stumbles, P. A., D. H. Strickland, C. L. Pimm, S. F. Proksch, A. M. Marsh, A. S. McWilliam, A. Bosco, I. Tobagus, J. A. Thomas, S. Napoli, A. E. Proudfoot, T. N. Wells, and P. G. Holt. (2001). Regulation of dendritic cell recruitment into resting and inflamed airway epithelium: use of alternative chemokine receptors as a function of inducing stimulus. *J Immunol* 167:228.

Stumbles, P. A., J. A. Thomas, C. L. Pimm, P. T. Lee, T. J. Venaille, S. Proksch, and P. G. Holt. (1998). Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 (Th2) responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity. *J Exp Med* 188:2019.

Suss, G., and K. Shortman. (1996). A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J Exp Med* 183:1789.

Swain, S. L., A. D. Weinberg, M. English, and G. Huston. (1990). IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol* 145:3796.

Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira. (2003). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21:335.

Takeuchi, O., T. Kawai, P. F. Muhlradt, M. Morr, J. D. Radolf, A. Zychlinsky, K. Takeda, and S. Akira. (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 13:933.

Talmor, M., A. Mirza, S. Turley, I. Mellman, L. A. Hoffman, and R. M. Steinman. (1998). Generation of large numbers of immature and mature dendritic cells from rat bone marrow cultures. *Eur J Immunol* 28:811.

Tanaka, H., C. E. Demeure, M. Rubio, G. Delespesse, and M. Sarfati. (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.

Tang, A., M. Amagai, L. G. Granger, J. R. Stanley, and M. C. Udey. (1993). Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature* 361:82.

Tang, H. L., and J. G. Cyster. (1999). Chemokine Up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells. *Science* 284:819.

Tebo, A. E., P. G. Kremsner, and A. J. Luty. (2002). Fcgamma receptor-mediated phagocytosis of Plasmodium falciparum- infected erythrocytes in vitro. *Clin Exp Immunol* 130:300.

- Termeer, C., F. Benedix, J. Sleeman, C. Fieber, U. Voith, T. Ahrens, K. Miyake, M. Freudenberg, C. Galanos, and J. C. Simon. (2002). Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* 195:99.
- Thoma-Uszynski, S., S. M. Kiertcher, M. T. Ochoa, D. A. Bouis, M. V. Norgard, K. Miyake, P. J. Godowski, M. D. Roth, and R. L. Modlin. (2000). Activation of toll-like receptor 2 on human dendritic cells triggers induction of IL-12, but not IL-10. *J Immunol* 165:3804.
- Thompson, C. B., T. Lindsten, J. A. Ledbetter, S. L. Kunkel, H. A. Young, S. G. Emerson, J. M. Leiden, and C. H. June. (1989). CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:1333.
- Trinchieri, G. (1995). Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 13:251.
- Trombetta, E. S., M. Ebersold, W. Garrett, M. Pypaert, and I. Mellman. (2003). Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science* 299:1400.
- Tseng, S. Y., M. Otsuji, K. Gorski, X. Huang, J. E. Slansky, S. I. Pai, A. Shalabi, T. Shin, D. M. Pardoll, and H. Tsuchiya. (2001). B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med* 193:839.
- Turley, S. J., K. Inaba, W. S. Garrett, M. Ebersold, J. Unternaehrer, R. M. Steinman, and I. Mellman. (2000). Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science* 288:522.
- Turnbull, E., and G. MacPherson. (2001). Immunobiology of dendritic cells in the rat. *Immunol Rev* 184:58.
- Valladeau, J., V. Duvert-Frances, J. J. Pin, C. Dezutter-Dambuyant, C. Vincent, C. Massacrier, J. Vincent, K. Yoneda, J. Banchereau, C. Caux, J. Davoust, and S. Saeland. (1999). The monoclonal antibody DCGM4 recognizes Langerin, a protein specific of Langerhans cells, and is rapidly internalized from the cell surface. *Eur J Immunol* 29:2695.
- Valladeau, J., O. Ravel, C. Dezutter-Dambuyant, K. Moore, M. Kleijmeer, Y. Liu, V. Duvert-Frances, C. Vincent, D. Schmitt, J. Davoust, C. Caux, S. Lebecque, and S. Saeland. (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.
- Vandenabeele, S., H. Hochrein, N. Mavaddat, K. Winkel, and K. Shortman. (2001). Human thymus contains 2 distinct dendritic cell populations. *Blood* 97:1733.
- Verbovetski, I., H. Bychkov, U. Trahtemberg, I. Shapira, M. Hareuveni, O. Ben-Tal, I. Kutikov, O. Gill, and D. Mevorach. (2002). Opsonization of apoptotic cells by autologous iC3b facilitates clearance by immature dendritic cells, down-regulates DR and CD86, and up-regulates CC chemokine receptor 7. *J Exp Med* 196:1553.
- Vicente, A., A. Varas, L. Alonso, M. Gomez de Moral, and A. G. Zapata. (1994). Ontogeny of rat thymic dendritic cells. *Immunology* 82:75.
- Vidalain, P. O., O. Azocar, H. Yagita, C. Roubardin-Combe, and C. Servedelprat. (2001). Cytotoxic activity of human dendritic cells is differentially regulated by double-stranded RNA and CD40 ligand. *J Immunol* 167:3765.

- Visintin, A., A. Mazzoni, J. H. Spitzer, D. H. Wyllie, S. K. Dower, and D. M. Segal. (2001). Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol* 166:249.
- 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.
- von Boehmer, H., and K. Hafen. (1986). Minor but not major histocompatibility antigens of thymus epithelium tolerize precursors of cytolytic T cells. *Nature* 320:626.
- Vremec, D., J. Pooley, H. Hochrein, L. Wu, and K. Shortman. (2000). CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol* 164:2978.
- Vremec, D., and K. Shortman. (1997). Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *J Immunol* 159:565.
- Vremec, D., M. Zorbas, R. Scollay, D. J. Saunders, C. F. Ardavin, L. Wu, and K. Shortman. (1992). The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J Exp Med* 176:47.
- Wagner, H. (1999). Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger. *Adv Immunol* 73:329.
- Walunas, T. L., D. J. Lenschow, C. Y. Bakker, P. S. Linsley, G. J. Freeman, J. M. Green, C. B. Thompson, and J. A. Bluestone. (1994). CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1:405.
- Webb, S., C. Morris, J. Sprent. (1990). Extrathymic tolerance of mature T cells: clonal elimination as a consequence of immunity. *Cell* 63:1249
- Weijer, K., C. H. Uittenbogaart, A. Voordouw, F. Couwenberg, J. Seppen, B. Blom, F. A. Vyth-Dreese, and H. Spits. (2002). Intrathymic and extrathymic development of human plasmacytoid dendritic cell precursors in vivo. *Blood* 99:2752.
- Wesa, A. K., and A. Galy. (2001). IL-1 beta induces dendritic cells to produce IL-12. *Int Immunol* 13:1053.
- Wolf, A. M., D. Wolf, M. Steurer, G. Gastl, E. Gunsilius, and B. Grubeck-Loebenstein. (2003). Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res* 9:606.
- Wolpe, S. D., G. Davatellis, B. Sherry, B. Beutler, D. G. Hesse, H. T. Nguyen, L. L. Moldawer, C. F. Nathan, S. F. Lowry, and A. Cerami. (1988). Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *J Exp Med* 167:570.
- Wong, B. R., R. Josien, S. Y. Lee, B. Sauter, H. L. Li, R. M. Steinman, and Y. Choi. (1997). TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J Exp Med* 186:2075.
- Wu, L., A. D'Amico, H. Hochrein, M. O'Keeffe, K. Shortman, and K. Lucas. (2001). Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors. *Blood* 98:3376.

Wu, L., A. D'Amico, K. D. Winkel, M. Suter, D. Lo, and K. Shortman. (1998). RelB is essential for the development of myeloid-related CD8alpha- dendritic cells but not of lymphoid-related CD8alpha+ dendritic cells. *Immunity* 9:839.

Wu, L., A. Nichogiannopoulou, K. Shortman, and K. Georgopoulos. (1997). Cell-autonomous defects in dendritic cell populations of Ikaros mutant mice point to a developmental relationship with the lymphoid lineage. *Immunity* 7:483.

Wyllie, D. H., E. Kiss-Toth, A. Visintin, S. C. Smith, S. Boussouf, D. M. Segal, G. W. Duff, and S. K. Dower. (2000). Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. *J Immunol* 165:7125.

Yasaka, N., M. Furue, and K. Tamaki. (1996). Expression of cutaneous lymphocyte-associated antigen defined by monoclonal antibody HECA-452 on human Langerhans cells. *J Dermatol Sci* 11:19.

Zal, T., A. Volkmann, and B. Stockinger. (1994). Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *J Exp Med* 180:2089.

Zarembek, K. A., and P. J. Godowski. (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.

Zhang, X., S. Sun, I. Hwang, D. F. Tough, and J. Sprent. (1998). Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 8:591.

Zou, W., J. Borvak, S. Wei, T. Isaeva, D. T. Curiel, and T. J. Curiel. (2001). Reciprocal regulation of plasmacytoid dendritic cells and monocytes during viral infection. *Eur J Immunol* 31:3833.