

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MEDECINE
École doctorale BIOLOGIE SANTÉ

Année 2010

N° 13

Rôle de l'hème-oxygénase et du monoxyde de carbone
dans le potentiel tolérogène des cellules dendritiques.

THÈSE DE DOCTORAT
Discipline : Sciences de la vie
Spécialité : Immunologie

*Présentée
et soutenue publiquement par*

TARDIF Virginie

Le 5 octobre 2010, devant le jury ci-dessous

Président : Yves DELNESTE, Directeur de Recherche, Angers

Rapporteurs : Jorge BOCZOWSKI, Directeur de recherche, Paris
Benoit SALOMON, Directeur de Recherche, Paris

Examineurs : Yves DELNESTE, Directeur de Recherche, Angers
Sylvaine YOU, Chargée de Recherche, Paris

Directeur de Thèse: Ignacio ANEGON, Directeur de Recherche, Nantes

Liste des Abréviations	5
Liste des figures	7
Liste des tableaux	8
INTRODUCTION	9
Partie I : La cellule dendritique « entre immunité et tolérance »	11
I- Hétérogénéité des cellules dendritiques.....	11
A. Les DCs à l'état d'équilibre chez la souris.....	12
1. DC résidentes conventionnelles des tissus lymphoïdes.....	12
2. DCs migrantes des tissus « non-lymphoïdes »	16
3. Les pDC	21
B. Les DC à l'état d'urgence : les DC inflammatoires.....	24
C. Origine des DC	25
1. L'origine myéloïde ou lymphoïde des DCs ?.....	25
2. Les précurseurs des cellules dendritiques.....	26
D. Quelques mots sur les DCs humaines et de rat.....	28
• Les DC humaines.....	28
• Les DCs de rat	30
E. Génération <i>in vitro</i> des DCs	31
II- La fonction des DCs	33
A. La maturation	33
1. La migration.....	34
2. Les récepteurs du non-soi : TLR, RLR et NLR	37
• Les TLRs	37
• Les RLRs	41
• Les NLRs.....	42
B. Capture antigénique.....	43
1. Macropinocytose.....	43
2. Endocytose médiée par des récepteurs	44
• Dépendante des clathrines.....	44
• Dépendante de la cavéoline	44
3. Phagocytose	44
4. Autophagocytose.....	45
5. Les récepteurs de capture antigénique	46
C. Apprêtement antigénique	47
1. Les voies endocytaires après l'internalisation des antigènes.	47
2. La voie de présentation antigénique <i>via</i> le CMH de classe I	50
3. La voie de présentation <i>via</i> le CMH de classe II	51
4. La voie de cross-présentation : la réunion des deux voies.....	54
5. Mécanismes de régulation des voies de présentation classe II et de cross-présentation	58
D. L'activation et la polarisation des lymphocytes T	61
1. L'activation initiale	61
2. La polarisation des lymphocytes CD4+.....	62
• Les Th1.....	63

• Les Th2.....	64
• Les Th17.....	64
• Les Tfh (T follicular helper).....	65
• Expression des récepteurs aux chimiokines par les T CD4+.....	65
3. Différenciation et mécanismes effecteurs des cellules T CD8+	66
E. La tolérance.....	67
1. La tolérance centrale.....	68
2. La tolérance périphérique	69
• Les mécanismes intrinsèques de tolérance périphérique.....	69
• Les mécanismes extrinsèques aux cellules T effectrices de la tolérance périphérique	70
3. Les DCs tolérogènes	73
• La terminologie et les mécanismes d'action des DCs tolérogènes	73
• Les DCs intrathymiques, hépathiques et les pDCs tolérogènes	75
• La génération in vitro des DCs tolérogènes.....	76
4. Le diabète de type 1 : la rupture de la tolérance	77
• Les mécanismes cellulaires et moléculaires du T1D	77
• Les stratégies d'immunothérapies dans le T1D	79
Partie II : Les propriétés immunorégulatrices de l'hème-oxygénase-1 et du monoxyde de carbone	83
.....	
I- Les effets immunosuppresseurs d'HO-1 sur le système immunitaire.....	83
A. HO-1 : une molécule immunosuppressive naturelle.....	83
B. HO-1 et infections : ami ou ennemi ?.....	84
C. Le rôle d'HO-1 dans les désordres immunitaires	85
1. L'allergie	85
2. L'auto-immunité.....	86
D. Les propriétés immunosuppressives d'HO-1 : un atout pour la transplantation.....	87
II- Les mécanismes d'action d'HO-1 au niveau des cellules de l'immunité	95
A. L'action directe d'HO-1 sur les lymphocytes T.....	95
B. L'activité d'HO-1 sur la biologie des macrophages permet la compréhension d'une partie des effets immunosuppresseurs d'HO-1.....	95
C. Les cellules dendritiques : le lien explicatif des capacités immunosuppressives d'HO-1 ?	96
Objectifs de la thèse	100
RÉSULTATS.....	102
I- Etude du rôle du CO dans la protection contre l'auto-immunité <i>via</i> les DCs : le diabète auto-immun de type I.	103
A. Mise au point du traitement au CO gaz	103
B. Le modèle murin de diabète auto-immun induit par les DCs	108
C. Article	110
"Carbon Monoxide treated DC induces normal peripheral autoreactive CD8+ T cell function but impairs their migration into the pancreas"	110
D. Résultats complémentaires.....	144
• La piste de la production de CCL3 par les cellules T Thy1.1+ CD8+ autoréactives..	144

• Etude de l'expression des récepteurs d'adressage impliqués dans la pathogénèse du diabète auto-immun de type 1.....	145
II- Etude de l'impact d'HO-1 et du CO dans le mécanisme de cross-présentation des DCs.....	147
A. Phénotype des BMDCs de souris.....	147
B. Sécrétion des cytokines.....	149
C. Test de cross-présentation.....	150
D. Etude de la capture antigénique.....	152
1. Endocytose médiée par les récepteurs au mannose.....	152
2. Phagocytose.....	153
E. Quantification des complexes CMH-I-peptide.....	154
F. Etude de la dégradation antigénique.....	157
1. Analyse de la dégradation par le DQ-OVA.....	157
2. Etude de la dégradation antigénique après phagocytose d'antigène particulaire.....	158
G. Interaction avec la NADPHoxydase.....	161
H. Interaction d'HO-1 et du CO avec un système bactérien.....	162
III-Conclusion.....	165
DISCUSSION.....	166
I- Le rôle du CO dans la protection contre l'auto-immunité <i>via</i> les DCs : le diabète auto-immun de type I.....	167
• Les perspectives.....	170
• Conclusions générales.....	175
II- HO-1/CO : Impact sur la cross-présentation par les DCs.....	178
III- Conclusion.....	182
BIBLIOGRAPHIE.....	183
ANNEXES.....	223

Liste des Abréviations

AAV : Adeno-associated virus	FoxP-3: Forkhead Box P-3
AEP : Asparagine EndoPeptidase	GM-CSF: Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor
AICD : Activation induced cell death	GMP: Granulocyte/Macrophage precursor
ACAD : Activated cell autonomous death	HA: Hémagglutinine (Virus de l'influenza)
AIRE: AutoImmune Regulator	HO-1: Hème-oxygénase-1
AMPc: Adénosine monophosphate cyclique	HSV: Herpes simplex virus
ARNm: Acide Ribonucléique messenger	ICAM-1: InterCellular Adhesion Molecule-1
ATG: AuTophagy-related Genes	IDO: Indoléamine 2,3 dioxygénase
BIR : Baculoviral IAP Repeat	IFN: Interféron
BMDC: Bone Marrow Derived DC	Ig : Immunoglobuline
CAN : Chronic allograft nephropathy	IL-3: Interleukine-3
CCL : C-C Chemokine Ligand	iNOS: inducible Nitric-Oxide Synthetase
CCR : Cystéine-Cystéine Chemokine Receptor	IPAF : IL-1 β -converting enzyme protease activating factor
CD40L: CD40 Ligand	IPSI-1 : Interferon beta promoter stimulator-1
cDC: Conventional DC	IRAP: Insulin Regulated AminoPeptidase
CDP: Common DC precursor	IRF: Interferon Regulatory Factor
CLP: Common Lymphoid precursor	iTregs : Lymphocytes T régulateurs induits
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité	LAMP-2 : Lysosomal Associated Membrane Protein-2
CMH-I : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I	LOX-1 : Lectin-like oxidized Lox-density lipoprotein receptor 1
CMH-II : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II	LPS : Lipopolysaccharide
CMP: Common Myeloid precursor	LRR : Leucine Rich Repeat
CO: Monoxyde de carbone	MAPK: mitogen-activated protein kinase
CoPP : Cobalt Protoporphirine	M-CSF: Macrophage colony stimulating factor
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène	Mda-5: Melanoma Differentiation-associated Domain5
CRD: Carbohydrate recognition domain	MMR: Macrophage Mannose Receptor
CTLA-4-Ig : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4-Immunoglobulin fusion protein	NADPH oxydase: Nicotinamide Adenosine Dinucleotide Phosphate oxydase
CX-CR: Cystéine-Acide Aminé-Cystéine ChimioKine Récepteur	NAIP : Neuronal Apoptosis Inhibitor Factor
DC: Dendritic Cell	NK: Natural Killer
DCIR-2: DC inhibitory receptor-2	NLR : NOD-like Receptor
EAE: Encéphalite allergique expérimentale	NOD: Nucleotide binding and Oligomerisation Domain
ERAD: ER-associated degradation	NP: Nucéoprotéine (virus de l'influenza)
ERAP: Endoplasmic Reticulum-AminoPeptidase	
Flt-3L: FMS related tyrosine kinase 3 ligand	

nTregs : Lymphocytes T régulateurs naturels

OVA: Ovalbumine

PAMP : Pathogen Associated Molecular
Pattern

pDC: Plasmacytoid DC

Pic: Protease cocktail Inhibitor

PRR : Pattern Recognition Receptor

PYD : Pyrin Domain

RAG-1: Recombinaison Activating Gene -1

RE : Réticulum endoplasmique

RIG-1: Retinoic acid-Inducible Gene-I

RLR : RIG-1-like Receptor

SNP : Single Nucleotide polymorphism

T1D: Type-1 diabetes

TAP: Transporter associated with antigen
processing

TGF: Transforming growth factor

Th1 : T helper 1

Th2 : T helper 2

TLR : Toll-like Receptor

TNF: Tumour Necrosis Factor

TNFR: Tumour Necrosis Factor Receptor

VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule-1

Liste des figures

Figure 1. Coopération entre les DCs migrantes et les DCs résidentes des ganglions lymphatiques.....	18
Figure 2. Les DCs locales coordonnent l'induction et l'exécution de la réponse immunes contre le HSV-1.	19
Figure 3. La morphologie des pDCs	22
Figure 4. La première étape de développement des DCs : les précurseurs hématopoiétiques.....	26
Figure 5. La différenciation des DCs chez la souris.	28
Figure 6. Reconnaissance des PAMPs par le TLR4, en surface cellulaire et le TLR3 intracellulaire.	40
Figure 7. Les différents mécanismes d'endocytose.	43
Figure 8. La voie de présentation antigénique via les molécules du CMH-I.	50
Figure 9. La voie de présentation antigénique via les molécules de CMH-II.	53
Figure 10. Les voies de présentation directe et de cross-présentation.....	54
Figure 11. Les Voies d'apprêtement antigénique potentielles de la cross-présentation.	56
Figure 12. Les mécanismes de régulation de la cross-présentation et de la voie du CMH-II.....	60
Figure 13. Hétérogénéité et plasticité des réponses CD4+.	63
Figure 14. Modèle de régulation de la réponse immune via.....	66
Figure 15. Les voies de la tolérance.....	67
Figure 16. Les mécanismes intrinsèques de la tolérance périphérique.	69
Figure 17. Les stades de maturation des DCs dans l'induction de la tolérance.....	74
Figure 18. La génération de DCs tolérogènes in vitro.....	77
Figure 19. Les mécanismes cellulaires et moléculaires dans le développement ou la prévention du T1D.	79
Figure 20. Modèle de la diversité des épitopes et de la thérapie tolérogène dans la pathogénèse du T1D chez la souris NOD.	82
Figure 21. Taux de carboxyhémoglobine relevés	104
Figure 22. Evaluation de la production d'IL-12p70 par les DCs	105
Figure 23. Evaluation de la production d'IL-10 par les DCs	106
Figure 24. Mise au point du modèle murin de.....	108
Figure 25. Les groupes contrôles du modèle de diabète.....	109
Figure 26. Production de CCL3 par les cellules CD8+ Thy1.1+ autoréactives.	145
Figure 27. Expression du CXCR3 sur les cellules T CD8+ Thy1.1.....	146
Figure 28. Phénotype des BMDCs de souris	148
Figure 29. Production de cytokines par les BMDCs de souris	149
Figure 30. Test de cross-présentation et de présentation antigénique directe.....	151
Figure 31. Etude de la capture antigénique des BMDCs par endocytose médiée par les récepteurs au mannose.	153
Figure 32. Etude de l'effet d'HO-1 et du CO sur la phagocytose par les BMDCs.	154
Figure 33. Analyse de l'expression des molécules du CMH de classe I	155
Figure 34. Etude de l'expression des complexes CMH-I-peptide OVA ₂₅₇₋₂₆₄ par les BMDCs de souris traitées au CO ou sur-exprimant HO-1.....	156
Figure 35. Dégradation antigénique du DQ-OVA par les BMDCs de souris après induction d'HO-1 ou traitement au CO.....	158
Figure 36. Etude de la dégradation phagosomale de l'ovalbumine	160
Figure 37. Etude de l'expression de la gp91phox après traitement au CO.....	162
Figure 38. Etude de l'effet d'HO-1 et du CO sur la survie de la Salmonella Typhimurium.....	163
Figure 39. Test de cross-présentation réalisée avec la souche bactérienne.....	164
Figure 40. Schéma récapitulatif de l'induction du diabète par les DCs dans le modèle murin Ins-HA.	176
Figure 41. Schéma récapitulatif de la protection contre le développement du diabète par les DCs traitées au CO gaz dans le modèle murin Ins-HA.....	177

Liste des tableaux

<i>Tableau 1. Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des DCs résidentes des organes lymphoïdes de souris.</i>	<i>15</i>
<i>Tableau 2. Synthèse des caractéristiques des DCs migrantes des tissus non lymphoïdes.</i>	<i>21</i>
<i>Tableau 3. Modèle de culture in vitro de DCs chez l'homme et la souris.</i>	<i>32</i>
<i>Tableau 4. Liste des effets HO-1 et/ou de ses produits de dégradation (CO ou bilirubine) dans les immuno-pathologies et la transplantation.</i>	<i>92</i>
<i>Tableau 5. Liste des effets de l'activité d'HO-1 sur les cellules immunitaires.</i>	<i>99</i>

INTRODUCTION

Le système immunitaire permet la protection de l'organisme contre les agents pathogènes ou les dérégulations internes de celui-ci telles que les tumeurs. Il est basé sur deux grands types de réponses immunitaires : **les réponses de l'immunité innée et celle de l'immunité adaptative.**

L'immunité innée correspond aux 1^{ères} lignes de défense de l'organisme, que constituent les réponses développées par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), dont font partis les macrophages et les cellules dendritiques (en anglais, *dendritic cells* : DC), les cellules natural killer (NK) et les neutrophiles. Ces réponses, peu spécifiques, ont pour but de détruire, par leur ingestion, de nombreux pathogènes et d'induire la sécrétion de cytokines. Cependant, ces réponses ne sont **pas toujours suffisantes à l'élimination du pathogène** et ceci est en partie lié au fait que l'immunité innée est incapable d'induire une réponse spécifique car il n'y a pas de reconnaissance de l'antigène. Les mécanismes de **l'immunité adaptative** vont alors permettre une **réponse spécifique** à l'infection grâce à des moyens élaborés, tels que la présentation antigénique et le développement d'une mémoire immunologique. Cette immunité adaptative est orchestrée par deux types de réponses : les réponses cellulaires médiées par les lymphocytes T et les réponses humorales médiées par les lymphocytes B, *via* la production d'anticorps. Cela dit, les cellules T ne peuvent reconnaître directement les pathogènes. Elles ont besoin des **DCs**, qui sont capables de capturer les antigènes en périphérie, de les apprêter sur leurs molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires pour les présenter aux lymphocytes T naïfs. Depuis leur découverte initiale dans l'épiderme en 1868 par Paul Langerhans (Langerhans, 1868) et leur caractérisation chez la souris en 1973 par Ralph Steinman (Steinman et Cohn, 2007), les DCs ont ainsi pris **une place centrale** dans l'étude des réponses immunitaires puisqu'elles sont à l'interface entre l'immunité innée (en périphérie) et l'immunité adaptative (dans les organes lymphoïdes primaires ou secondaires). En effet, la particularité des DCs, comparée aux macrophages et aux neutrophiles également présents dans les 1^{ères} lignes de défense, est de dégrader les antigènes non pas dans un but de destruction mais dans un but de conservation des épitopes pour la présentation aux cellules T. C'est pourquoi elles sont nommées les **CPA professionnelles**. D'autre part, l'immunité adaptative est également impliquée dans **les phénomènes de tolérance aux antigènes**. Là encore, la DC, en fonction des antigènes capturés et des signaux qu'elle reçoit, va jouer le rôle central de balance entre immunité et tolérance.

Partie I : La cellule dendritique « entre immunité et tolérance »

I-Hétérogénéité des cellules dendritiques

Les DCs sont des cellules **d'origine hématopoïétique** dérivant de la moelle osseuse, très hétérogènes, qui diffèrent *in vivo* par leur localisation, leur fonction immunologique, leur capacité de migration et leur génération (Shortman et Naik, 2007).

Une 1^{ère} distinction entre les DCs peut-être faite par rapport à leur stade de différenciation. Ainsi on nomme les cellules qui correspondent à un stade de précurseurs des DCs, **les pré-DCs** (précurseur de DC) distinctes **des DCs conventionnelles ou classiques** (en anglais, *conventional DC*, cDC), qui sont totalement différenciées morphologiquement et fonctionnellement. Les pré-DCs correspondent à la dernière étape de différenciation précédant l'obtention d'une cDC et nécessitant peu ou pas de divisions cellulaires supplémentaires.

D'une manière générale, chez la souris, 2 principales sous-populations de DCs, présentes dans **les organes lymphoïdes secondaires** sont décrites : **les cDCs** et les **DCs plasmacytoïdes** (en anglais, *plasmacytoid DC*, pDC), aussi appelées cellules produisant l'interféron (IFN). Parmi les cDCs, on distingue classiquement les **DCs résidentes des organes lymphoïdes** et les **DCs migrantes des tissus non lymphoïdes** (Segura et Villadangos, 2009). Cela dit, le terme cDC étant sujet à confusion, certains l'utilisant pour désigner uniquement les DC résidentes dans les organes lymphoïdes (Merad et Manz, 2009), il est préférable d'opposer les DC résidentes des organes lymphoïdes et les DCs migrantes des organes non-lymphoïdes aux pDCs.

Enfin, certaines DCs ne sont présentes dans l'organisme qu'à la suite d'une infection ou d'un état d'inflammation. Ces DCs représentent une dernière sous-population regroupée sous le terme **DC inflammatoires** et sont de ce fait opposées aux sous-populations de DCs présentes à l'état de repos décrites précédemment.

Une caractéristique les réunit cependant : l'expression à des niveaux plus ou moins important du marqueur CD11c (intégrin αX).

A. Les DCs à l'état d'équilibre chez la souris

1. DC résidentes conventionnelles des tissus lymphoïdes

Ces DCs résident dans les organes lymphoïdes, tels que la rate, les ganglions lymphatiques, le thymus et la moelle osseuse. Elles ne migrent pas à travers le système lymphatique et leur fonction est **restreinte à un seul organe** (Shortman et Naik, 2007). Elles sont caractérisées par l'expression des marqueurs phénotypiques CD11c et CMH de classe II (CMH-II). Le CD11c est fortement exprimé, les DCs résidentes sont donc CD11c^{hi} (en anglais, *high*). D'autre part, elles ont un phénotype dit « immature », caractérisé par une faible expression des molécules de co-stimulation et une faible production de cytokines, et une capacité active dans la capture et l'apprêtement antigénique.

Chez la souris, les DCs résidentes de la rate peuvent être distinguées selon les marqueurs de surface qu'elles expriment. **Trois sous-populations de DCs spléniques** sont ainsi décrites :

- Les CD8⁺ ou CD11c⁺CMH-II⁺CD11b⁻CD4⁻CD8⁺
- Les CD8⁻ ou CD11c⁺CMH-II⁺CD11b⁺CD4⁺CD8⁻
- Les double négatives ou CD11c⁺CMH-II⁺CD11b⁺CD8⁻CD4⁻

A l'état d'équilibre, ces différentes sous-populations sont différemment localisées : les CD8⁺ sont retrouvées dans la zone des cellules T et la zone marginale, les CD8⁻ et les double négatives dans la zone marginale et la pulpe rouge (Vremec et al., 2000; Idoyaga et al., 2009). Après stimulation, chaque population migre dans la zone des cellules T.

Les DCs CD8⁺ et CD8⁻ sont, d'autre part, différentes par leur **capacité de présentation antigénique**. En effet, même si une des caractéristiques des DCs est de capturer et présenter les antigènes, les rôles des différents types de DCs *in vivo* ne sont pas équivalents au niveau de la présentation antigénique. Les capacités intrinsèques de présentation antigénique de chaque population peuvent par exemple être influencées par leur situation anatomique, leur accessibilité aux antigènes ou l'effet que peuvent exercer certains pathogènes sur les DCs (Villadangos et Schnorrer, 2007). Les DCs présentent des **antigènes d'origine endogène** (produit par la cellule elle-même) ou **d'origine exogène** (synthétisé par d'autres cellules et capturé par les DCs par différents mécanismes) (voir II-C). De manière générale, il a été mis en évidence que les DCs conventionnelles étaient capables de présenter des antigènes viraux endogènes avec une grande efficacité. Par exemple, les CD8⁺ et les CD8⁻ spléniques présentent les antigènes viraux sur leurs molécules du CMH-I et du CMH-II, lorsqu'elles sont infectées par le virus simplex de l'herpès (en anglais, Herpes simplex virus, HSV) (Wilson et al., 2006) ou le virus de l'influenza (Young et al., 2007). En revanche, cela n'est pas vrai pour les antigènes exogènes, qui sont

capturés par différents récepteurs suivant leur nature. En effet, les CD8⁺ et les CD8⁻ expriment différemment d'autres marqueurs de surface que ceux cités précédemment, qui fournissent à chaque sous-population des capacités distinctes dans la capture antigénique et l'initiation des réponses immunes spécifiques des pathogènes. Par exemple, les CD8⁺ expriment le récepteur de type lectin-C, **CD205 (ou DEC205)**, alors que les CD8⁻ expriment le **DCIR-2 (en anglais, DC Inhibitory receptor -2)**, reconnu par l'anticorps 33D1 et le récepteur de type lectin C, **dectin-1** (Tableau 1). Ces 3 récepteurs sont impliqués dans la capture antigénique des antigènes exogènes. Les antigènes capturés par le DEC205 des DCs CD8⁺ sont majoritairement présentés sur les molécules de CMH de classe I (CMH-I), c'est la voie de cross-présentation. Les DCs CD8⁺ sont également capables de cross-présenter les antigènes exogènes solubles, associés aux billes de latex ou cellulaires (après ingestion de cellules mortes)(den Haan et al., 2000; Iyoda et al., 2002; Schnorrer et al., 2006) (Tableau 1). Contrairement aux DCs CD8⁺, les DCs CD8⁻ sont inefficaces dans la cross-présentation des antigènes solubles, associé aux billes de latex (Schnorrer et al., 2006) ou captés par DCIR-2 ou dectin-1 (Dudziak et al., 2007; Carter et al., 2006). Ces antigènes seront plutôt présentés par les molécules du CMH-II. Une exception existe cependant : les CD8⁻ cross-présentent les antigènes uniquement lorsqu'ils sont capturés par les récepteurs Fc (Tableau 1). Ainsi, **les CD8⁺ sont les spécialisées dans la cross-présentation efficacement** des antigènes exogènes et donc elles sont **capables d'induire des réponses des lymphocytes T CD8**. Inversement, **les CD8⁻ semblent être plus efficaces dans la présentation des antigènes exogènes sur les molécules du CMH-II** et donc **dans l'induction des réponses des lymphocytes CD4** (Pooley et al., 2001; Villadangos et Schnorrer, 2007; Miloud et al., 2010)(Tableau 1).

De plus, les DC CD8⁺ et CD8⁻ montrent des différences dans la sécrétion des cytokines et l'induction des réponses T CD4⁺ auxiliaires. Ainsi, les **DCs CD8⁺** ont une prédominance dans la sécrétion de **l'IL-12p70** et la stimulation de réponses **T CD4⁺ auxiliaires de type 1** (en anglais, *T helper 1*, Th1), contrairement aux **DCs CD8⁻** qui ne sécrètent généralement que **peu IL-12p70 mais plus d'IL-10** et induisent des réponses **T CD4⁺ auxiliaires de type 2** (en anglais, *T helper 2*, Th2). Une dernière différence entre ces 2 sous-populations de DCs est soulignée : leur capacité à induire des lymphocytes T régulateurs (Tregs) CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ (Forkhead Box P3). En effet, les **DCs CD8⁺ CD205⁺** sont capables **d'induire des Tregs FoxP3⁺ (iTregs)** fonctionnels à partir de précurseurs FoxP3⁻ grâce à la production de TGF-β endogène par celles-ci et en présence d'IL-2 exogène, contrairement aux **DCs CD8⁻ DCIR-2⁺** qui sont pourtant **meilleures stimulatrices de Tregs FoxP3⁺ naturels (nTregs)** produits directement au niveau du thymus et plus efficaces dans la formation des complexes

CMH-II-peptides (Yamazaki et al., 2008; Dudziak et al., 2007)(Tableau 1). Encore une fois, les différents sous-types de DCs semblent avoir des fonctions complémentaires.

Les **DCs CD8⁺ et CD8⁻** sont **présentes dans le thymus**. Elles peuvent être aussi discriminées par un autre marqueur de surface : le Sirp- α (en anglais, *Signal regulatory protein- α* , CD172a). Dans le thymus, où se différencient les futurs lymphocytes T exprimant le CD8 $\alpha\beta$, ce marqueur permet de mieux distinguer les DCs CD8⁺ (dont la forme est un homodimère $\alpha\alpha$) du thymus, qui expriment faiblement le SirP- α , des DCs CD8⁻, qui au contraire l'expriment fortement (Shortman et Heath, 2010). La majorité des DCs thymiques est localisée dans la médulla. Les DCs CD8⁺ Sirp- α ⁻ sont plus importante en nombre que les DCs CD8 α ⁻ Sirp- α ⁺, qui semblent être des DCs migrantes venant de la périphérie (Donskoy et Goldschneider, 2003). Les DCs thymiques jouent un rôle dans la sélection négative des cellules T (voir II-E) (Brockner et al., 1997; Gallegos et Bevan, 2004). Cependant, la contribution de chaque sous-population de DCs thymiques dans ce phénomène reste encore à être établie, même si les DCs CD8 α ⁻ Sirp- α ⁺ semblent être plus impliquées que les autres sous-populations dans la génération *in vitro* de cellules T régulatrices (Proietto et al., 2008).

Les DCs des ganglions lymphatiques sont plus hétérogènes car, en plus, des **DCs CD8⁺ et CD8⁻**, elles incluent aussi des **DCs migrantes des tissus périphériques**, dont la description est faite dans le chapitre suivant. En ce qui concerne les DCs résidentes, les DCs CD8⁺ sont localisées dans la région paracorticale des ganglions, alors que les DCs CD8⁻ sont retrouvées dans la zone périfolliculaire et le sinus sous-capsulaire des ganglions (Miloud et al., 2010).

Le Tableau 1 propose une synthèse des différentes caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des DCs CD8⁺ et CD8⁻ résidentes des organes lymphoïdes, précédemment évoquées dans cette partie.

Tableau 1. Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des DCs résidentes des organes lymphoïdes de souris.

D'après Villadangos et Schnorrer, Nature Immunol. Reviews, 2007 et Pulendran et al, Curr. Op. Immunol., 2008.

DCs résidentes	CD8 ⁺	CD8 ⁻	DCs résidentes	CD8 ⁺	CD8 ⁻
Localisation			Présentation Voie CMH-I		
			Antigène endogène	++	++
Rate	+	+			
Thymus	+	+			
Ganglion	+	+			
Phénotype			Cross-présentation		
			Antigène exogène		
CD11c	+++	+++	Soluble	++	-
CD4	-	+	Phagocyté		
CD8	++	-	Cellules	++	-
CD11b	-	++	Billes de latex	++	-
Langerin	+	-			
CD205	+	-	Endocyté <i>via</i> récepteurs		
SirP	-	+	CD205	++	N/A
DCIR-2	-	+	FcR	++	++
			DCIR-2	N/A	-
			Dectin-1	N/A	-
Fonctions			Présentation Voie CMH-II		
			Antigène endogène	++	++
Production de cytokines			Antigène exogène		
IL-12p70	+++	+/-	Soluble	++	++
IL-10	+/-	+++	Phagocyté		
TGF-β	+	-	Cellules	+	+/-
			Billes de latex	+/-	++
Réponses T induites	Th1	Th2	Endocyté <i>via</i> récepteurs		
	iTregs	nTregs	CD205	+	N/A
			FcR	+	++
			DCIR-2	N/A	++
			Dectin-1	N/A	++

iTregs : lymphocytes T régulateurs induits

nTregs : lymphocytes T régulateurs naturels

2.DCs migrantes des tissus « non-lymphoïdes »

Les DCs migrantes permettent la présentation des antigènes périphériques au niveau des organes lymphoïdes : on dit qu'elles ont **un rôle de sentinelles**. Ces DCs vont migrer constitutivement à travers le système lymphatique jusqu'aux ganglions lymphatiques drainant le territoire en question au niveau des zones riches en cellules T. Cette migration est exacerbée en réponse à un signal de danger, représentant une alerte qui active les réponses immunitaires innée et adaptative et qui peut être la conséquence d'une infection microbienne ou d'une cellule endommagée (Miloud et al., 2010). Une caractéristique commune est leur fort niveau d'expression de CD11c et du CMH-II.

Les cellules de Langerhans (en anglais, *Langerhans cells*, LC), que l'on retrouve dans l'épiderme de la peau, sont **l'exemple typique des cellules migrantes**. Elles représentent un réseau cellulaire et occupent les interstices entre les kératinocytes de la peau. Elles sont caractérisées par l'expression de la **lectine langerine (CD207)** et par la présence de **granules de Birbeck**, présumés intervenir dans l'apprêtement antigénique et dont la formation est induite par l'engagement de la langerine (Miloud et al., 2010). Les LC expriment aussi des **molécules d'adhésion**, comme la **E-cadhérine** et la molécule d'adhésion aux cellules épithéliales **EpCAM** (en anglais, epithelial-cell adhesion molecule)(Tang et al., 1993; Helft et al., 2010), qui permettent l'accrochage des LC aux kératinocytes, ainsi que **le CD205**, impliqué dans la capture antigénique. La E-cadherine se lie également au CD103 (α E-integrin) exprimé par des lymphocytes T et certaines sous-populations de DC (voir ci-dessous)(Merad et al., 2008). **Lorsqu'elles migrent**, les LCs voient leur **expression en CMH-II redistribuée et augmentée à la membrane**. On observe également une **augmentation du CD40** (marqueur de co-stimulation) et **du CCR-7** (CC-chemokine récepteur-7), indispensable à la migration vers les ganglions lymphatiques. A l'inverse, l'E-cadherine est diminuée, facilitant son détachement des kératinocytes, tandis que l'EpCAM reste stable. Le CD205 est également sur-exprimé pour former les LCs migrantes typiquement retrouvées dans les ganglions drainant la peau : **les CMH-II^{hi}CD11c⁺CD205⁺Langerine⁺**.

Même si les LCs semblent être dotées de mécanismes de capture de l'antigène, leur rôle dans la présentation antigénique reste controversé. Plusieurs études ont montré que les LCs contribuaient à l'immunité induite par la sensibilité de contact (Bennett et al., 2005) et la tolérance au soi (Waithman et al., 2007), mais ces conclusions ne sont pas universelles (Kaplan et al., 2005; Bursch et al., 2007), d'autres populations de DCs de la peau sont responsables de la présentation antigénique et de l'hypersensibilité de contact comme les DCs dermales langerine⁺ (Bursch et al., 2007).

En effet, **dans la peau, on distingue aussi 2 autres populations DC situées dans les couches dermales** : ce sont les **DCs CD103⁺ Langerine⁺ CD11b^{lo}** (en anglais, *low*, lo) et les **DCs CD103⁻Langerine⁻CD11b^{hi}** (Merad et al., 2008). Les DCs dermales CD103⁺CD11b^{lo} n'expriment pas le récepteur à chimiokine CX3CR1, contrairement aux DCs dermales CD103⁻CD11b^{hi} et seraient impliquées dans la présentation antigénique (voir ci-après)(Ginhoux et al., 2007). En plus de ces deux sous-populations, **une 3^{ème} population a été retrouvée dans le derme : les DCs CD103⁻CD11b⁻langerine⁻**. Ce dernier sous-type migre vers les ganglions lymphatiques drainant en conditions inflammatoires (Shklovskaya et al., 2008).

Ces 3 sous-populations, décrites dans le derme, sont similairement **retrouvées dans le parenchyme pulmonaire**, où elles s'accumulent près des épithéliums des voies respiratoires, mais également **dans les reins, les îlots pancréatiques et le foie**. Le phénotype des ces sous-populations de DCs est similaire à celui de leurs homologues du derme, mis à part pour l'expression de la langerine, qui varie selon le tissu et est nulle au niveau des DCs des îlots pancréatiques (Ginhoux et al., 2009) (Tableau 2).

Au niveau de l'intestin, 3 populations ont été identifiées :

- **une population CD103⁺CD11b⁻CD8α⁺ dans les plaques de Peyer**
- **2 populations dans la lamina propria : CD103⁻CD11b^{hi} et CD103⁺CD11b⁺**

Le CX3CR1 est exprimé seulement par les DCs CD103⁻CD11b⁺ et est absent des CD103⁺CD11b⁻ et CD103⁺CD11b⁺ (Tableau 2).

Parmi ces 3 populations, **la CD103⁺CD11b⁺ propre à la lamina propria** fait partie des plus étudiées. Cette population exprime **constitutivement le CCR-7** et sont les premières à transporter les bactéries pathogéniques (*Salmonella*) du tractus intestinal aux ganglions lymphatiques mésentériques (Bogunovic et al., 2009). De plus, ces DCs CD103⁺CD11b⁺, au repos, sont les seules à migrer vers les ganglions mésentériques et sont nécessaires à la différenciation des Tregs et pourraient donc être impliquées dans l'induction de la tolérance (Coombes et al., 2007) (Tableau 2). Les DCs CD103⁻CD11b⁺ sont capables, quant à elles, d'étendre leurs dendrites entre les cellules épithéliales jusqu'à la lumière intestinales (Rescigno et al., 2001) et ce mécanisme est lié à l'expression du CX3CR1 et permet l'élimination du pathogène (Niess et al., 2005). De plus en présence d'ATP bactérien, les DCs CD103⁻CX3CR1⁺ dirige la différenciation des cellules T CD4⁺ en cellules Th17, qui jouent un rôle important dans l'élimination des bactéries et des pathogènes fongiques et produisent de l'IL-17 (Tableau 2). Ainsi, il était plausible de penser que les DCs CD103⁻CX3CR1⁺ étaient les premières à atteindre les ganglions lymphatiques mésentériques pour présenter les antigènes microbiens, or il semble qu'elles représentent une population de DC résidentes des tissus périphériques. Une hypothèse est à envisager, cependant : les DCs

CD103⁺CX3CR1⁺ pourraient être responsables de la capture antigénique et transférer les antigènes aux DCs CD103⁺CX3CR1⁻, mais ceci reste à être démontré (Rescigno, 2009). D'autant plus que ce **phénomène de transfert d'antigènes** est connu au niveau des ganglions de la peau **entre les DCs migrantes et les DC résidentes des organes lymphoïdes** (Figure 1). En effet, dans un modèle d'infection épidermale par le virus de l'herpès-1 (HSV-1, en anglais *Herpes simplex virus*), Allan et al. ont été les premiers à suggérer que les LCs migrantes pouvaient agir comme des transporteurs d'antigènes sans être elles-mêmes impliquées dans la présentation antigénique, les DCs CD8⁺ résidentes des ganglions lymphatiques étant nécessaires pour activer la réponse immune (Allan et al., 2003). Trois ans plus tard, ils montrent dans le même modèle que les DC dermales migrantes (et non les LCs) ne présentent pas directement l'antigène, mais que le blocage de leur migration réduit fortement la présentation antigénique par les DCs CD8⁺ résidentes des ganglions drainant, qui induisent les réponses des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques de façon exclusive quand le HSV-1 est injecté par voie intraveineuse, dans la patte ou après scarification de la peau (Allan et al., 2006; Iwasaki, 2009).

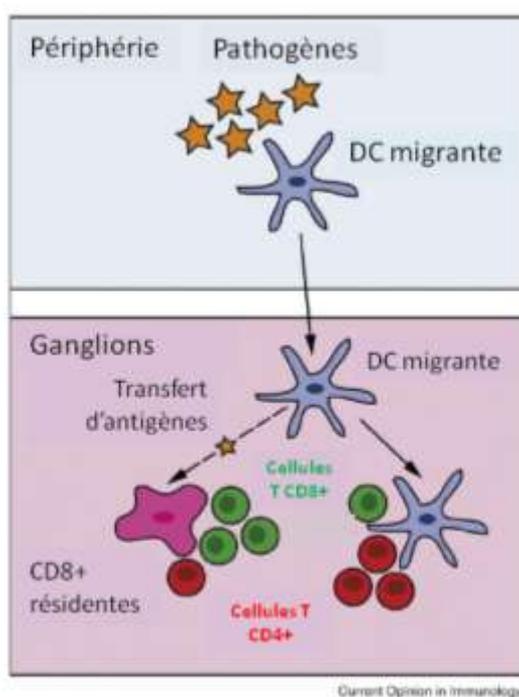


Figure 1. Coopération entre les DCs migrantes et les DCs résidentes des ganglions lymphatiques. A la suite d'une infection, les DCs migrantes capturent les antigènes et atteignent les ganglions lymphatiques, où elles présentent l'antigène aux cellules T CD8⁺ ou CD4⁺. Elles peuvent aussi transférer ces antigènes pathogéniques aux DCs résidentes des organes lymphatiques. D'après Segura et Villadangos, Curr. Op. Immunol., 2009.

Dans ce même modèle d'infection par scarification cutanée au HSV-1, **le rôle des DCs CD103⁺CD11b⁻ dans la cross-présentation** a été récemment mis en évidence. Ces travaux montrent que le HSV-1 possède 2 phases d'infection aiguës : la 1^{ère} phase se déroule au site de scarification par infection virale des kératinocytes alentours avant que le virus n'entre dans les cellules neuronales qui innervent cette zone. Le HSV-1 va ensuite envahir la racine dorsale des ganglions nerveux où il se réplique de façon importante. La 2^{ème} phase d'infection ou réactivation du virus se produit par retour du virus dans l'épiderme innervé par les ganglions nerveux infectés (Figure 2). Ce modèle permet ainsi d'évaluer les différents types de DCs dans leur potentiel d'activation des réponses T cytotoxiques. Comme l'avait montré Allan et al., durant la 1^{ère} phase d'infection, les DCs CD8⁺ résidentes des ganglions lymphoïdes sont identifiées responsables de la cross-présentation des antigènes viraux. Cela dit, lors de la phase de réactivation, ce sont **les DCs dermales CD103⁺CD11b⁻** qui sont **exclusivement impliquées dans la cross-présentation** des antigènes viraux (Bedoui et al., 2009) alors que les DCs dermales CD103⁻CD11b^{hi} sont les principales CPA pour les lymphocytes T CD4⁺ après la 1^{ère} infection ou la réactivation du HSV-1 (Figure 2)(Iwasaki, 2009)(Bedoui et al., 2009).

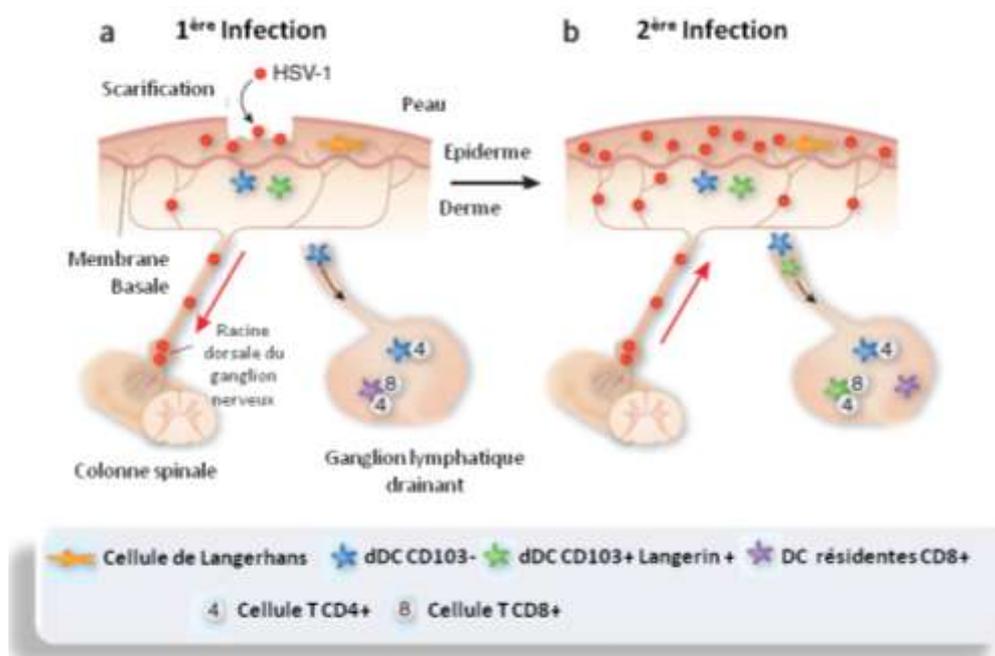


Figure 2. Les DCs locales coordonnent l'induction et l'exécution de la réponse immunes contre le HSV-1. (a) La scarification des couches superficielles de l'épiderme permet la 1^{ère} infection du HSV-1 qui se réplique localement. Le virus atteint les ganglions nerveux *via* les terminaisons nerveuses de la peau et entre en phase de latence. Les DCs dermales (dDC) captent l'antigène et migrent vers les ganglions lymphatiques, où elles activent les cellules T CD4⁺, alors que l'activation des cellules T CD8⁺ est exclusivement due à la cross-présentation des antigènes par les DCs CD8⁺ résidentes des organes lymphoïdes. (b) La réactivation du virus latent se traduit par le retour des virions vers le derme et l'infection des cellules épithéliales alentours. Dans cette phase naturelle de réinfection, les DCs dermales CD103⁺langerin⁺ sont responsables de la cross-présentation des antigènes viraux et non plus les DCs CD8⁺ résidentes. D'après Iwasaki, Nature Immunol., 2009.

Bien que toutes ces sous-populations de DCs semblent avoir des fonctions différentes et être spécialisées, il est également important de comprendre comment ces populations coopèrent. Ainsi, un nouveau **modèle de coopération séquentielle** entre les différents sous-types de DCs a été récemment proposé. En effet, les DCs résidentes et les DCs migrantes des ganglions lymphatiques sont toutes les deux requises pour la sélection clonale et la prolifération des cellules T CD4⁺ après immunisation sous-cutanée. Les DCs résidentes piègeraient les cellules T CD4⁺ spécifiques de l'antigène et initieraient leur activation. Cette activation reste cependant insuffisante à leur expansion clonale. Ce sont donc les DCs migrantes qui permettraient l'expansion clonale des cellules T CD4⁺ retenues par les DCs résidentes (Allenspach et al., 2008). De cette façon, il y aurait un type de DCs pour alerter et retenir les quelques cellules T spécifiques de l'antigène et ensuite un autre type pour assurer leur expansion clonale et leur différenciation. Cela dit, ce modèle ne semble pas être applicable aux infections périphériques où l'antigène n'est pas capable d'atteindre les ganglions lymphatiques *via* le système lymphatique et doit être apporté par les DCs migrantes. Le Tableau 2 propose un résumé des caractéristiques des différentes populations de DCs des organes non lymphoïdes.

Tableau 2. Synthèse des caractéristiques des DCs migrantes des tissus non lymphoïdes. D'après Helft et al, Immunological reviews, 2010, Liu et al, Immunological reviews, 2010, Shklovskaya et al, J. Immunol., 2008 et Segura et al, Curr. Op. Immunol., 2009.*Pas d'expression de la langerine (exception pancréas et plaques de peyer) ** Excepté DCs de la Lamina propria intestinale # *in vitro*, les LCs humaines sont cependant capables de cross-présentation des antigènes solubles aux cellules T CD8+ et d'induire des réponses Th2 (Klechevsky et al., 2008) ; N/A : Non applicable ; ND : Non déterminé.

	LC	CD103 ⁺ CD11b ^{lo}	CD103 ⁻ CD11b ^{hi}	CD103 ⁺ CD11b ⁺	CD103 ⁻ CD11b ⁻
Localisation	Epiderme	Derme Poumon Foie Rein Pancréas* Plaques de Peyer*	Derme Poumon Foie Rein Pancréas <i>Lamina Propria</i>	<i>Lamina propria</i>	Derme
Phénotype					
CD11c	+	+++	+++	+++	+++
CD45	+	+	+	+	+
CMH-II	+	+	+	+	+
Langerin	+	+	-	-	-
CD11b	+++	-/+	+++	+++	-
CX3CR1	+	-	+	-	-
CD103	-	+	-	+	-
F4/80	+	-	+	-	ND
EpCAM	+	ND	ND	ND	ND
SirPα	ND	-	+	+	ND
Fonctions					
-Présentation CMH-II	+	+	++	ND	ND
-Cross-présentation (infection virale et immunisation ovalbumine)	-#	+++	-	ND	ND
-Transport des antigènes aux ganglions	+++	+++	+++**	+++	+++
Lamina propria	N/A	N/A	Th17	Tregs	N/A

3. Les pDC

Caractérisées chez l'homme en 1997 (Grouard et al., 1997), les pDCs ont été caractérisées chez la souris par 3 différents groupes en 2001 (Asselin-Paturel et al., 2001; Björck, 2001; Nakano et al., 2001). Elles représentent une population rare de cellules circulantes à la **morphologie ronde typique des cellules plasmacytoïdes**, qui leur a d'ailleurs valu leur appellation (Figure 3) (Miloud et al., 2010). Elles constituent également une population de DCs localisées dans la rate, les ganglions lymphatiques et les plaques de

Peyer (Pulendran et al., 2008). La **production de grandes quantités d'IFN α de type I** en réponse à une infection virale est une de leur principale caractéristique. Elles expriment les marqueurs phénotypiques **Ly6c/g (Gr1)**, **B220 (CD45R)**, CD4, et de **façon intermédiaire ou faible le marqueur CD11c**. Le marqueur pour le CMH-II est quant à lui peu ou pas exprimé mais son expression est augmentée après stimulation, ainsi que les molécules de co-stimulation, telles que le CD40 et CD86 (Asselin-Paturel et al., 2001). Contrairement aux autres sous-populations de DCs, elles expriment peu le marqueur CD8 α et pas du tout le CD11b (Asselin-Paturel et al., 2001; Björck, 2001). Cela dit, l'activation des pDCs par des stimuli microbiens ou viraux peut induire une forte expression du marqueur CD8 (Asselin-Paturel et al., 2001) et la **conversion en DCs** CD8 $^+$ CD205 $^-$ distinctes des DCs conventionnelles CD8 $^+$ CD205 $^+$ (O'Keeffe et al., 2002). Cette conversion en DC peut aussi être induite par une stimulation *via* le CD40L (CD40 Ligand) ou l'IL-3 (Interleukine-3) (Figure 3) (Grouard et al., 1997). Ainsi, à l'état d'équilibre les pDCs peuvent être présentées comme des **pré-DCs**, correspondant à un stade particulier, précoce et stable dans le temps de la DC (Shortman et Naik, 2007).

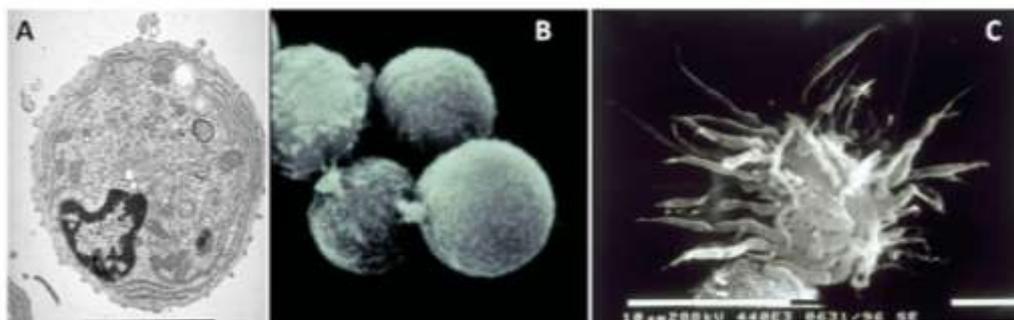


Figure 3. La morphologie des pDCs (A) Les pDCs, en microscopie électronique, ont une morphologie lymphoblastique, avec un noyau rond ou oval excentré et un appareil de golgi et un réticulum endoplasmique rugueux développé. (B) Les pDCs, au repos, ont une morphologie sphérique et lisse. (C) Après stimulation au CD40L, les pDCs acquièrent une morphologie type cellule dendritique, avec des dendrites allongées. D'après Colonna et al., Nature Immunol., 2004.

Comme c'est le cas pour les cDCs, existe-il **plusieurs sous-populations de pDC ?** Cette hypothèse reste encore à éclaircir. En effet, certains groupes ont distingué plusieurs types de pDC fonctionnellement différents suivant l'expression de RAG-1 (Recombinaison Activating Gene -1 : enzyme assurant le réarrangement des gènes du répertoires des cellules T et B) (Pelayo et al., 2005) ou de la chimiokine CCR-9 (C-C Chemokine Receptor - 9) (Hadeiba et al., 2008). Mais, il a récemment été démontré que le sous-groupe de pDC CCR-9 $^-$ serait en fait des précurseurs des cDCs (pré-cDCs), distinctes des pDCs, puisque incapables de produire de l'IFN α en réponse au CpG (cytosine polyguanine) non méthylé (motif de l'ADN microbien)(Segura et al., 2009) .

Par ailleurs, les pDCs montrent un **profil de circulation et de migration assez différents des cDCs**. En effet, lors d'une infection ou d'une inflammation, il semblerait que les pDCs s'accumulent dans les tissus inflammés (GeurtsvanKessel et al., 2008; Baldwin et al., 2004; Smit et al., 2006), mais, contrairement aux cDCs, les pDCs y entreraient *via* la veine à endothélium élevée (Grouard et al., 1997; Yoneyama et al., 2004), même si d'autres modèles montrent la présence de pDCs dans le système lymphatique afférent (Pascale et al., 2008). D'autre part, comme il a été montré chez le mouton après injection de CpG ou infection virale (Pascale et al., 2008)(Hemati et al., 2009), le taux de migration des pDCs vers les ganglions n'est pas augmenté à l'inverse des cDCs migrantes. Cette différence n'a pas été retrouvée chez la souris après infection avec le virus syncytial respiratoire (en anglais, respiratory syncytial virus, RSV), mais l'accumulation des pDCs au niveau du site de l'infection reste tout de même plus importante que pour les cDCs (Smit et al., 2006). Ainsi, les pDCs auraient plus un rôle de présentation antigénique et/ou un rôle d'immunomodulateur au niveau du site de l'infection plutôt qu'un rôle de transport de l'antigène vers les ganglions lymphatiques, comme cela est suggéré par l'étude de De Heer, qui montre que les pDCs suppriment les fonctions effectrices des cellules T induites par les cDCs sans altérer leur prolifération (de Heer et al., 2004).

Concernant la capacité des pDCs à présenter les différents types d'antigènes, le problème est de savoir avec quelle efficacité elles en sont capables, notamment en comparaison avec les cDCs.

Plusieurs études ont montré que les pDC étaient capables de présenter efficacement les antigènes endogènes *via* les molécules de CMH-I ou de CMH-II (Krug et al., 2003; Villadangos et Young, 2008; Young et al., 2008)(Krug et al., 2003), mais pas les antigènes exogènes (présentés par les molécules du CMH-II). En effet, les pDCs semblent avoir une régulation de l'expression des complexes CMH-II-peptides et de leur recyclage différente de la cDC. Contrairement aux cDCs, le recyclage des molécules du CMH-II n'est pas diminué par l'activation des pDCs (Young et al., 2008) : ceci se traduit donc par une incapacité pour la pDC de présenter durablement des antigènes exogènes en surface. Ainsi, en présence de faibles quantités d'antigènes exogènes, seules les cDC pourront présenter efficacement les antigènes aux niveaux des ganglions (de Heer et al., 2004). Mais au niveau des sites d'inflammation ou d'infection, la pDC activée, contrairement à la cDC, même infectée, gardera la capacité de renouveler son répertoire d'antigènes exogènes pour informer les cellules T récemment arrivées de leur environnement (Villadangos et Young, 2008). Ceci est d'autant plus important que les pDCs sont de faibles stimulatrices des cellules T naïves, alors qu'elles peuvent efficacement permettre la différenciation des cellules T, lorsqu'elles sont pré-activées par des cDCs ou mémoires (Krug et al., 2003; de Heer et al., 2004). Ainsi,

les pDCs et les cDCs auraient des propriétés de présentation antigénique complémentaires plutôt que quantitativement différentes.

Pour finir qu'en est-il de la capacité des pDCs de cross-présenter les antigènes? Plusieurs études ont montré que les pDCs d'origine murine étaient incapable de cross-présenter les antigènes (Salio et al., 2004; Sapoznikov et al., 2007). Récemment, ces données ont été contrastées par d'autres groupes qui ont montré que les pDCs murines d'origine splénique étaient capables de cross-présenter les antigènes exogènes solubles ou particulaires, si celles-ci étaient activées *via* les récepteurs Toll-like récepteur (TLR) (Mouriès et al., 2008). Une autre étude, utilisant des lignées de pDCs, démontrent que les pDCs immatures sont également capables de cross-présenter des antigènes viraux issues de la capture de cellules entières infectées par le virus de l'influenza (Lui et al., 2009). Ainsi, l'origine des discordances est sûrement liée aux différentes sources de pDCs utilisées (spléniques, (Mouriès et al., 2008) ou dérivées de la moelle osseuse, (Salio et al., 2004)), de leur état de maturation ou de la source des antigènes capturés. De la même façon, suivant l'infection virale étudiée, d'autres divergences ont été établies sur le mode d'action des pDCs: les pDCs sembleraient être indispensables à l'élimination du RSV (Smit et al., 2006) ce qui n'est pas le cas pour le virus de l'influenza (GeurtsvanKessel et al., 2008), suggérant que **la biologie des pDCs est encore à éclaircir.**

B. Les DC à l'état d'urgence : les DC inflammatoires

Cette dernière classe de DCs n'est pas présente à l'état de repos de l'organisme. En effet, elles se développent à la suite d'une inflammation ou d'une infection microbienne. Le meilleur exemple de DCs dont la présence est consécutive à une inflammation est les DCs **dérivées des monocytes CCR-2+Ly6C+**. Ces monocytes inflammatoires, lorsqu'ils sont transférés par voie intraveineuse dans une souris saine, ne se différencient pas en DCs présentes à l'état d'équilibre. Inversement, s'ils sont transférés dans une souris sujette à une très forte inflammation, ils se différencient en DCs dans le péritoine et entrent dans la rate pour donner des types distincts de DCs (Geissmann et al., 2003; Naik et al., 2006). Lorsque ces monocytes inflammatoires sont dérivés d'une souris déficiente pour le récepteur au GM-CSF (en anglais, granulocytes/macrophages – colony stimulating factor), ils ne se développent pas en DCs CMH-II+, bien qu'ils entrent dans la rate de receveur en inflammation (Shortman et Naik, 2007). Ainsi, la génération de telles DCs inflammatoires est dépendante du GM-CSF. Ces DCs inflammatoires dérivées des monocytes se distinguent des DCs présentes au repos par leur phénotype CD11c intermédiaire, par leur phénotype CD11c^{int}CD11b^{hi}Mac3⁺ (une glycoprotéine eprimée par les macrophages activés). Ces DCs n'expriment ni le CD4, ni le CD8. Ces DCs ressemblent à une autre classe de DCs

inflammatoires **caractérisées par la production de TNF α et de iNOS** (en anglais, inducible Nitric oxide synthase) et nommées **Tip DCs**. Les Tip DCs sont présentes dans la rate de souris infectées par la *Listeria monocytogenes* (Serbina et al., 2003), et dans les uro-épithéliums de souris infectés par *Escherichia Coli* (Engel et al., 2006). Les Tip DCs ne sont pas nécessaires à l'induction des réponses des cellules T mais semblent nécessaires à l'élimination de l'infection bactérienne dans certains cas (Serbina et al., 2003), mais pas dans tous (Engel et al., 2006).

C. Origine des DC

1. L'origine myéloïde ou lymphoïde des DCs ?

Les DCs, ainsi que toutes les cellules sanguines, trouvent leur **origine dans les cellules souches hématopoïétiques** (en anglais, hematopoietic stem cell, **HSC**). Ces HSCs, qui s'auto-renouvellent dans la moelle osseuse adulte, donnent lieu à une série de précurseurs qui progressivement vont être dédiés à une lignée cellulaire particulière. La première étape dans le développement des précurseurs cellulaires est la séparation entre les précurseurs d'origine myéloïde et lymphoïde, mis en évidence par la découverte dans la moelle osseuse d'un **progéniteur commun lymphoïde** (en anglais, common lymphoid progenitor, **CLP**) (Kondo et al., 1997) et d'un **progéniteur commun myéloïde** (en anglais, common myeloid progenitor, **CMP**) (Akashi et al., 2000). Le CMP donne naissance aux lignées érythrocytes, mégacaryocytes, granulocytes et macrophages tandis que les CLP est à l'origine des lymphocytes B, T et des cellules NK (Figure 4). Initialement, les DCs furent considérées comme des cellules de lignée myéloïde, car elles avaient de nombreuses similarités avec les macrophages et qu'elles étaient retrouvées dans des colonies de granulocytes et de macrophages générées à partir de cellules de la moelle osseuse et sous traitement au GM-CSF (Inaba et al., 1993a). Ainsi ce fut une surprise quand on s'aperçut qu'un progéniteur lymphoïde isolé du thymus d'une souris pouvait se différencier en DCs (Ardavin et al., 1993). L'hétérogénéité des DCs pouvait être expliquée par leur origine myéloïde ou lymphoïde : les précurseurs myéloïdes générant les DCs CD8⁻ et les précurseurs lymphoïdes générant les DCs CD8⁺, le marqueur CD8 étant typique des lignées lymphocytaires. Mais, ceci est maintenant controversé car il a été mis en évidence que les CLPs et CMPs pouvaient générer tous les types de DCs (Chicha et al., 2004; Manz et al., 2001). Cependant, une cytokine cruciale pour le développement des pDCs et des DCs à l'état d'équilibre permet de ségréger les précurseurs lymphoïdes et myéloïdes suivant leur expression du récepteur au Flt-3L (FMS-related tyrosine kinase 3 Ligand). En effet, les souris déficientes pour Flt-3L ou STAT3 (un facteur de transcription impliqué dans la voie de signalisation de Flt-3) présentent un déficit important de DCs et pDCs (McKenna et al., 2000;

Laouar et al., 2003). Ainsi, quelque soit l'origine des précurseurs (myéloïde ou lymphoïde), la caractéristique requise pour que ces précurseurs se différencient en DC est leur expression du récepteur au Flt-3L. (D'Amico et Wu, 2003) (Figure 4).

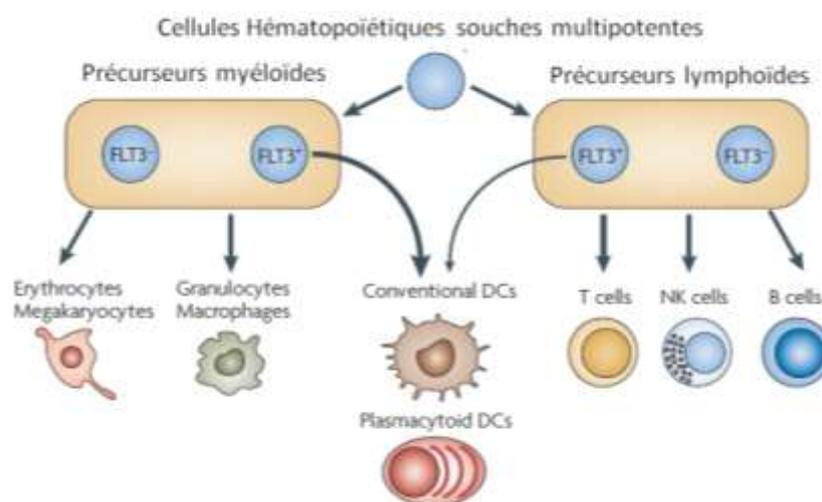


Figure 4. La première étape de développement des DCs : les précurseurs hématopoïétiques. A l'origine, les précurseurs des cellules sanguines étaient divisés en 2 types de précurseurs : les myéloïdes et les lymphoïdes. Il s'avère en fait qu'il s'agit plus vraisemblablement de séries de précurseurs, dont certains expriment le récepteur au Flt-3. Ces précurseurs myéloïdes et lymphoïdes qui expriment ce récepteur représentent ceux qui ont la plus grande capacité à se différencier en DCs. Les DCs classiques et les pDCs peuvent être issues de chaque précurseur Flt-3+ suivant leur disponibilité, le tissu impliqué et l'environnement local. Il est vraisemblable que les précurseurs myéloïdes représentent la source principale de DCs dans la plupart des cas. D'après Shortman et Naik, Nature Rev Immunol., 2007.

2. Les précurseurs des cellules dendritiques.

A la suite du CMP, on trouve d'autres précurseurs successifs dédiés à certaines lignées cellulaires tels que le progéniteur des granulocytes-macrophages (GMP, en anglais, granulocyte-macrophage progenitor) puis le **progéniteur des macrophages-DCs (MDP**, en anglais, macrophage-DC progenitor). Les MDP sont des cellules de la moelle osseuse qui partagent des caractéristiques phénotypiques avec les cellules myéloïdes et donnent un grand nombre de macrophages et de sous-types de DCs, mais ne peut plus se différencier en granulocytes (Fogg et al., 2006). Le MDP, dont le phénotype est c-kit+CX3CR1+Lin⁻ (pour absence de marqueur de lignées, va se différencier en monocytes et en **précurseur commun des DCs** (en anglais, common DC precursor, **CDP**) (Figure 5) (Geissmann et al., 2010). Les CDP expriment le récepteur au Flt3-L et au M-CSF. Leur phénotype est CD11c⁻ CMH-II⁻ c-kit^{int} Lin⁻ (Sathe et Shortman, 2008). Les **CDP sont également des cellules proliférantes qui vont se différencier en pDCs et en pré-DCs** dans la moelle osseuse mais ne peuvent plus donner de monocytes (Liu et al., 2009). Les pré-DCs sont retrouvées, au repos, dans la moelle osseuse, le sang et la rate. **Dans la rate**, ces pré-DCs sont

hétérogènes pour l'expression du CD24 et se dissocient en **2 populations CD24^{hi} et CD24^{lo}, qui donneront les DCs CD8⁺ et CD8⁻ spléniques respectivement** (Sathe et Shortman, 2008). Les pré-DCs rentrent dans les organes lymphatiques et s'intègrent au réseau des DCs, où elles acquièrent une morphologie et un phénotype des DCs grâce à des divisions cellulaires contrôlées par des Tregs, le Flt3 (Liu et al., 2009) et le récepteur à la lymphotoxin-β (Kabashima et al., 2005). D'autre part, **ces pré-DCs peuvent aussi se différencier en DC CD103⁺CX3CR1⁻ de la lamina propria intestinale** (Bogunovic et al., 2009). Ainsi, **le CDP serait à l'origine des DCs présentes à l'état d'équilibre.**

A l'inverse, les monocytes donnent naissance aux DCs inflammatoires de type Tip DCs *via* les monocytes Ly6C⁺ et à un certain nombre de macrophages (Figure 5). **Les monocytes Ly6C⁺ sont également à l'origine des DCs CD103⁻CX3CR1⁺ de la lamina propria intestinale** (Bogunovic et al., 2009)(Figure 5).

Il existe cependant **des exceptions à ce modèle classique : les LCs**. En effet, les LCs sont indépendantes de la moelle osseuse pour leur régénération à l'état d'équilibre et probablement durant l'inflammation (Merad et Manz, 2009). Les LCs se développent à partir d'un précurseur embryonnaire qui colonise l'épiderme avant la naissance et se différencie *in situ*, ensuite il prolifère durant les 5 premières semaines de vie pour établir le réseau de LC dans l'épiderme (Chorro et al., 2009). Les LCs adultes s'auto-renouvellent *in situ* et peuvent proliférer massivement en cas d'inflammation. Ainsi, les LCs sont capables de se renouveler localement indépendamment d'un précurseur circulant, ce qui en fait une de leur principale caractéristique et laisse à penser qu'elle représente une population unique de DC, même si les DCs d'autres épithéliums stratifiés ont aussi été baptisés LC du fait de leur localisation et de leur expression de la langerine (Helft et al., 2010).

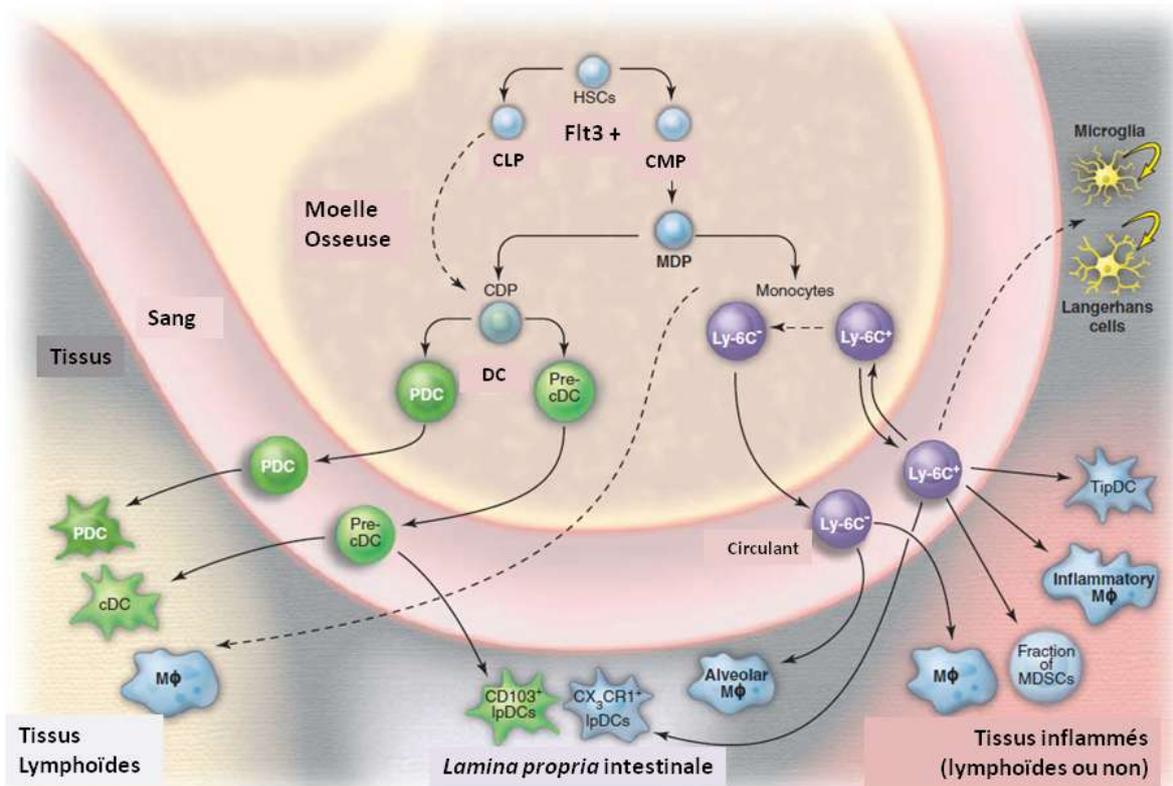


Figure 5. La différenciation des DCs chez la souris. Dans la moelle osseuse, les HSCs produisent le progéniteur myéloïde CMP et le progéniteur lymphoïde CLP, dont le sous-groupe exprimant le récepteur au FIt-3 produit la grande majorité des DCs. Les DCs sont pensées être essentiellement d'origine myéloïde, mais la part de DCs d'origine lymphoïde reste encore à clarifier. Le CMP se différencie en précurseur des macrophages et des DCs (MDP), qui donnera les monocytes et le précurseur commun des DCs (CDP). Le CDP est à l'origine des pDCs et des pré-DCs. Les pré-DCs circulent dans le sang et entrent dans les tissus lymphoïdes, où ils se différencieront en DCs CD8⁺ et DCs CD8⁻, ou les tissus non lymphoïdes où ils donneront par exemple les DCs CD103⁺CX3CR1⁻ de la lamina propria intestinale. Les monocytes sont divisés en 2 sous-groupes suivant leur expression du Ly6C. Les Ly6C⁻ contribuent à la production de plusieurs types de macrophages en conditions d'équilibre. Les Ly6C⁺ sont à l'origine des DCs CD103⁻CX3CR1⁺ de la lamina propria intestinale. D'autre part en conditions d'inflammation, les Ly6C⁺ peuvent se différencier en DCs inflammatoires dérivées des monocytes, macrophages inflammatoires et pourraient contribuer à la formation des cellules suppressives myéloïdes. Ces monocytes Ly6C⁺ sont aussi suspectés de produire la microglie et les LCs, qui sont capables d'auto-renouvellement indépendamment de la moelle osseuse. D'après Geissmann et al., Science, 2010.

D. Quelques mots sur les DCs humaines et de rat

Bien que mon travail de thèse n'ait porté que chez la souris, il me semble important de resituer brièvement les populations de DCs chez l'homme et le rat.

→ Les DC humaines

Chez l'homme, les HSCs dans le sang, la moelle osseuse et le cordon ombilical expriment le marqueur **CD34+**. Les cellules CD34+ sont capables de se différencier en différentes lignées cellulaires hématopoïétiques et notamment en celles aboutissant aux DCs.

On distingue également **les DCs du sang**, qui représentent la principale source de DCs chez l'homme. Les DCs fraîchement isolées du sang sont CD11c⁺Lin⁻HLA-DR (CMH-II)⁺. Elles peuvent se subdiviser en **3 populations cDC** : **les CD1c⁺** (BDCA-1), **les CD141⁺** (BDCA-3) et **les CD16⁺**, auxquelles il faut ajouter **les pDCs CD303⁺** (BDCA-2) **CD304⁺** (BDCA-4) (Ju et al., 2010).

Les DCs CD1c⁺ viennent de la moelle osseuse, circulent dans le sang et migrent de façon constante vers les organes lymphoïdes secondaires et tissus périphériques, où elles deviennent des DCs interstitielles. Ces cellules expriment les marqueurs myéloïdes CD11c, CD13, CD33 et représentent environ 0,6% des cellules mononucléaires du sang périphériques (en anglais, peripheral blood mononuclear cell, PBMC).

Les DCs CD141⁺ ne représentent que 0,04% des PBMCs. Ces DCs expriment la protéine Clec9 qui est également exprimée par les DCs murines CD8⁺ (Caminschi et al., 2008), ce qui laisse supposer que les DCs CD141⁺ humaines peuvent être les homologues des CD8⁺ murines. Récemment, 2 études viennent de montrer que ces DCs **CD141⁺ présentaient une capacité supérieure de cross-présentation**, les caractérisant comme **les équivalents des CD8⁺ murines** (Jongbloed et al., 2010; Bachem et al., 2010).

Les DC CD16⁺ (à ne pas confondre avec les monocytes CD14⁺CD16⁺, voir ci-dessous) représentent la plus grande population HLA-DR⁺Lin⁻ du sang (jusqu'à 50% des DCs CD11c⁺ sanguines) et sont reconnues par l'anticorps MDC-8. Elles ont pour phénotype : CD11c⁺CD14⁻CD1c⁻C5aR⁺CD45RA⁺ et sont la principale source de TNF-α et IL-12p70 quand elles sont stimulées par le lipopolysaccharide (LPS) ou le CD40-Ligand (Schäkel et al., 2006). Elles sont donc un type cellulaire pro-inflammatoire, ce qui indique de possibles similarités avec les DC dérivés des monocytes.

Les **monocytes** font également partis des cellules sanguines. Ils expriment le marqueur **CD14⁺**. Ils peuvent être séparés suivant leur expression de CD16. Les monocytes **CD14^{hi}CD16^{lo}** représentent la **population prédominante** du sang humain. Ces cellules semblent être des cellules résidentes dans les tissus et des précurseurs de macrophages, ostéoclastes, microglie (Gordon et Taylor, 2005). Ce sont ces cellules qui sont utilisées en routine comme précurseur de DC pour la génération de DC *in vitro* (Sallusto et Lanzavecchia, 1994). Cette sous-population de monocytes CD14^{hi}CD16^{lo} est connue pour **produire des cytokines anti-inflammatoires**, telles que l'IL-10 et expriment le **CCR2**. En revanche, les cellules **CD14^{lo}CD16^{hi}** représentent moins de 10% des monocytes CD14⁺ et sont **CCR2⁻**. Ces monocytes CD14^{hi}CD16^{lo}CCR2⁻ ont une **forte expression de cytokines pro-inflammatoires** comme le TNFα et l'IL-6 mais produisent peu d'IL-10, après stimulation

in vitro et ont des capacités de présentation antigénique (Ziegler-Heitbrock, 2007; Mizuno et al., 2005).

Enfin, on retrouve également chez l'homme **les LCs**, qui expriment le marqueur CD1a, non exprimé chez la souris et une **population dermale**, qui est **CD209⁺CD206⁺CD207⁻**.

On trouve également des populations distinctes de DCs dans les amygdales, les ganglions lymphatiques, la rate et le thymus.

→ Les DCs de rat

Chez le rat, deux sous-populations de DCs ont été identifiées dans la lymphe intestinale par le groupe de MacPherson (Pugh et al., 1983). Ces DCs expriment le marqueur CD103 reconnu par l'anticorps OX62 (Brenan et Puklavec, 1992) et se distinguent par leur expression des marqueurs CD4⁺ et Sirp- α . Au laboratoire, il a été identifié deux populations de DCs présentes dans la rate et les ganglions lymphatiques : les **DCs CD4⁺OX62^{lo}** et les **DCs CD4⁻OX62^{hi}**. Contrairement à la souris, les DCs de rate n'expriment pas le CD8. Les DCs CD4⁻ produisent de grandes quantités d'IL12 et de TNF α et induisent une différenciation Th1, mais présentent une faible capacité de stimulation des lymphocytes T CD8⁺ allogéniques. Inversement, les DCs CD4⁺ stimulent efficacement les lymphocytes T CD8⁺ allogéniques et induisent une différenciation des lymphocytes T CD4⁺ non polarisée (Th1 ou Th2), mais produisent de faibles quantités d'IL-12 et de TNF α (Voisine et al., 2002). Il semblerait que les DCs CD4⁻ soient l'équivalent des DCs CD8⁺ murines et que les DCs CD4⁺ correspondent aux DCs CD8⁻ murines.

Des **pDCs spléniques** sont aussi décrites chez le rat. Elles ont un phénotype **CMH-II⁺CD4⁺CD11b⁻** mais **n'expriment pas le marqueur OX62**, ce qui les distingue des 2 autres sous-populations de DCs (Hubert et al., 2004).

Comme nous le verrons dans la partie 2 de cette introduction (voir II-c), certaines sous-populations de DC, que ce soit chez l'homme, le rat ou la souris, expriment préférentiellement une molécule, qui a retenue mon attention durant ces 3 années de thèse : l'hème-oxygénase-1 (HO-1), renforçant encore l'idée que chaque sous-population de DC exerce des rôles fonctionnels distincts mais complémentaires.

E. Génération *in vitro* des DCs

Les DCs sont des populations rares, et beaucoup d'études ont donc pris pour partie de trouver des techniques *in vitro* de culture de DCs. Le Tableau 3 propose un récapitulatif des différentes techniques de génération de DCs pour l'homme et la souris.

La méthode pour l'homme et la souris la plus largement utilisées est la culture de DCs **à partir de monocytes supplémentés de GM-SCF et dans certains cas d'IL-4**. Cependant, cette méthode génère des DCs qui manquent d'hétérogénéité, en comparaison aux DCs trouvées dans les tissus lymphatiques et qui sont **plus proches de DCs inflammatoires que de DCs à l'état d'équilibre**. D'autant plus, que plusieurs études montrent que les souris déficientes pour le GM-CSF ou son récepteur ne présentent aucun défaut dans le développement de leur DCs spléniques à l'état d'équilibre (Vremec et al., 1997; Hikino et al., 2000). Il en est de même pour les souris déficientes pour le M-CSF ou son récepteur qui présentent un défaut de monocytes mais pas de problème dans le développement des DCs au repos (Wiktor-Jedrzejczak et al., 1990), suggérant que les monocytes ne sont pas *in vivo* les précurseurs des DCs résidentes des tissus. Ceci est en corrélation avec le fait que les monocytes sont censés induire des DCs inflammatoires, comme je l'ai décrit plus haut.

Cela dit, une molécule est importante dans le développement des DCs à l'état d'équilibre, c'est le **Flt-3-L**, comme cité précédemment. De façon logique, et au vue du déficit de DCs dans les souris qui l'expriment pas, il semble raisonnable de penser que ce facteur, à l'inverse du GM-SCF et de l'IL-4, soit impliqué dans le développement des DCs à l'état de repos. Et, en effet, dans les cultures de cellules de la moelle osseuse *in vitro* supplémenté en Flt-3L, l'hétérogénéité des DCs est trouvée semblable à celles décrites dans les tissus lymphoïdes tels que la rate (Brasel et al., 2000) (Tableau 3). Cependant, ces DCs générées avec du Flt-3L n'expriment pas le marqueur CD8⁺ si caractéristique des populations spléniques. Cela dit, la ségrégation des 2 sous-populations de DCs est possible grâce à l'expression d'autres marqueurs maintenus sur ces DCs comme le CD24 et par leurs fonctions semblables à leur homologue splénique comme la capacité de cross-présentation des antigènes exogènes (Naik et al., 2005). De plus, 2 précurseurs ont été isolés de ces cultures *in vitro* avec le Flt-3L : un précurseur semblable au CDP et un autre semblable au pré-DC, décrit précédemment (Naik et al., 2007). Ces 2 précurseurs sont en voie de différenciation en pDCs, DCs CD8⁺ et DCs CD8⁻. Ainsi, **les cultures *in vitro* au Flt-3L font un modèle approprié pour l'étude du développement des DCs à l'état d'équilibre**. Cela dit, ce modèle présente des limites. Les trois compartiments où se déroulent la

différenciation des DCs *in vivo* est réduit à un seul puits de culture et les quantités de Flt-3L utilisées sont bien supérieures que celles détectées à l'état d'équilibre.

Tableau 3. Modèle de culture *in vitro* de DCs chez l'homme et la souris.

D'après Shortman et Naïk, Nature Immunol., 2007.

Précurseurs	Conditions de culture	Sous-populations de DCs générées	Références
Moelle osseuse de souris, enrichie en précurseurs Lin ⁻ c-kit ⁺	GM-CSF (± TNF ± SCF)	LCs, DCs inflammatoires dérivées des monocytes, DCs interstitielles.	(Inaba et al., 1993b)(Lutz et al., 1999)(Nikolic et al., 2003)(Zhang et al., 1998)
Moelle osseuse de souris	Flt-3L	pDCs, DCs CD8 ⁺ , DCs CD8 ⁻	(Brasel et al., 2000)(Naik et al., 2005)(Brawand et al., 2002)(Gilliet et al., 2002)
Thymus de souris, Cellules T précurseurs	Mélange de 7 cytokines sans GM-CSF	DCs thymiques	(Saunders et al., 1996)
Splénocytes de souris	GM-CSF (+surnageant de fibroblastes 3T3)	DCs inflammatoires ?	(Berthier et al., 2000)(Winzler et al., 1997)
	Milieu uniquement	Cellules CMH-II-CD11c- (Equivalence incertaine)	(O'Neill et al., 2004)
Human monocytes	GM-CSF (+IL-4)	DCs inflammatoires (DCs dérivées des monocytes)	(Sallusto et Lanzavecchia, 1994)
	Migration Transendotheliale	DCs interstitielles, DCs migrantes	(Randolph et al., 1998)(Schaerli et al., 2005)
	Equivalent epidermal	LCs	(Schaerli et al., 2005)
Human CD34 ⁺ precursors	GM-CSF (± TNF ± IL-3 ± TGFβ ± SCF)	DCs interstitielles, LCs, DCs inflammatoires (dérivées des monocytes)	(Caux et al., 1996)(Caux et al., 1993)(Strobl et al., 1996)

Dans le cadre de ma thèse, les études ont été réalisées essentiellement à partir de DCs dérivées de la moelle osseuse de souris en présence de gm-csf, correspondant à des DCs inflammatoires *in vivo*.

II-La fonction des DCs

A. La maturation

Les DCs, comme je l'ai dit précédemment, peuvent exister sous **2 états de base** : «**immature**» et «**mature**». Classiquement, les DCs immatures sont caractérisées par une expression faible des marqueurs de co-stimulation, tels que le CD80, CD86 (B7.1 et B7.2, respectivement) et CD40 et des molécules du CMH, ainsi qu'une forte activité de capture antigénique. Au contraire, les DCs ayant entamé un processus de maturation vont voir leurs molécules de co-stimulation augmentées et vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-12, le TNF- α . Leur capacité de capture antigénique est diminuée, du fait d'une diminution des récepteurs d'endocytose et/ou de phagocytose (Banchereau et al., 2000). De plus, les DCs matures montrent **un trafic intracellulaire et un réarrangement des complexes CMH-peptide à la surface cellulaire différent de celui observé à l'état immature**. Les DCs immatures sont moins efficaces que les DCs matures dans la dégradation des antigènes et dans la formation des complexes CMH-peptide (Théry et Amigorena, 2001). Des changements dans les compartiments lysosomaux sont également observés, au cours de la maturation, comme la surexpression de LAMP-2 (en anglais, Lysosomal Associated Membrane Protein), un marqueur de la membrane lysosomal. D'autre part, la maturation est associée à **un changement morphologique** : les DCs vont acquérir des dendrites par réorganisation de leur cytosquelette et perdre leur adhésion aux éléments environnants (Winzler et al., 1997). On observe également **un changement de l'expression des récepteurs à chimiokines**. Tous ces changements morphologiques vont permettre aux DCs d'acquérir une forte motilité cellulaire et *in vivo* cela se traduit par une migration des DCs de la périphérie vers les organes lymphoïdes secondaires (Banchereau et Steinman, 1998). Ainsi, la maturation des DCs va aboutir à des cellules capables d'activer des lymphocytes T naïfs et d'initier une forte réponse immunitaire adaptative, les DCs immatures au contraire sont généralement considérées comme inductrices de tolérance (Banchereau et Palucka, 2005).

Cela dit, **cette classification de l'état de maturation associée à un phénotype est remise en question** (Reis e Sousa, 2006). En effet, il apparaît que des DCs matures phénotypiquement peuvent ne pas être immunogènes, mais au contraire tolérogènes au regard des réponses T CD8+ qu'elles insuissent. Cette différence entre ces 2 réponses ne réside pas dans l'état de maturation des DCs mais pourrait être lié à la présence ou l'absence de réponses *via* les cellules T auxiliaires (Albert et al., 2001) : l'absence de cellules T CD4⁺ permettant plutôt une tolérance ou dans la balance d'expression de cytokines pro- ou anti-inflammatoires. Ainsi, la maturation se définirait plus **comme une fonction**

effectrice, plutôt qu'un phénotype apparent. D'autre part, **la migration des DCs n'est pas forcément associée à la maturation de celle-ci**. En effet, il apparaît que certaines catégories de DCs sont capables d'endocyter des cellules apoptotiques constitutivement et de les transporter au niveau des zones de cellules T des organes lymphoïdes de l'organisme (Huang et al., 2000). Cette phagocytose de cellules apoptotiques conduit à une tolérance périphérique (Steinman et al., 2000) (les DCs restant immatures phénotypiquement), contrairement à la phagocytose de cellules en nécroses qui induit une maturation des DCs et une activation forte des réponses cellulaires T (Sauter et al., 2000). Ces DCs peuvent également présenter un **phénotype semi-mature**, semblable aux DCs migrantes de l'organisme à l'état d'équilibre (Lutz et Schuler, 2002b), nuancé le modèle classique : immature-toléro-gène ; mature-immunogène.

1. La migration

Les cDCs vont migrer tout au long de leur vie de la moelle osseuse aux tissus périphériques puis vers les organes lymphoïdes secondaires. Cette migration est essentielle au bon déroulement de la réponse immunitaire et nécessite des signaux de recrutement, qui peuvent émaner des sites d'inflammation (tels que des cytokines ou chimiokines pro-inflammatoires) ou émanant des tissus normaux qui recrutent des précurseurs de DCs nécessaires au renouvellement des DCs résidentes des tissus. Pour répondre à ces signaux, les DCs vont exprimer **des molécules d'adhésion spécifiques et des récepteurs de chimio-attractant induit par la maturation**. Les **DCs immatures** (et quelques précurseurs des DCs, particulièrement les monocytes) vont utiliser des voies récepteurs-chimiokines, tels que **CCR2-CCL2** (Geissmann et al., 2003), **CCR5-CCL5** (Yamagami et al., 2005) et **CCR6-CCL20** (Merad et al., 2004) pour accéder et circuler dans les tissus périphériques non-lymphoïdes. Quand les **DCs deviennent matures**, elles diminuent leurs réponses à ces voies et vont circuler dans les voies lymphatiques des ganglions drainant **en augmentant l'expression du CCR7**, dont les ligands sont le CCL19 et CCL21 (Dieu et al., 1998)(Förster et al., 2008).

Cela dit, un faible nombre de DCs migre également vers les ganglions en absence de signaux d'inflammation. Le CCR7 semble jouer un rôle, bien que les mécanismes ne soient pas encore très clairs. En effet, le CCR7 est généralement induit au niveau des DCs par des signaux d'inflammation. Pour expliquer l'implication du CCR7 dans la migration des DCs à l'état d'équilibre, il faudrait que les DCs augmentent leur expression du CCR7 sans être totalement matures. L'activation du récepteur de surface Ig-like TREM-2 (en anglais, Triggering Receptors Expressed on Myeloid cells-2) sur les DCs dérivées des monocytes humaines montrent que le CCR7 peut être induit sur ces cellules sans augmentation des

marqueurs de co-stimulation et autres marqueurs de maturation (Bouchon et al., 2001). Chez la souris déficiente pour DAP-12, une molécule adaptatrice de TREM-2, on observe une accumulation des DCs dans la peau et l'intestin au repos (Tomasello et al., 2000). D'autre part, DAP-12 et TREM-2 sont également connus pour leur interaction avec la plexin-A1 et la semaphorine-D, un ligand-récepteur couplé qui régule des voies d'adhésion médiées par les intégrines et le cytosquelette (Takegahara et al., 2006).

La migration des DCs vers les ganglions lymphatiques est le résultat d'une série d'évènements qui inclut : **la mobilisation, le détachement, la migration interstitielle, l'entrée dans les voies lymphatiques afférentes et le transit *via* la lymphe**. Bien que cette migration doive se dérouler dans tous les tissus, la compréhension de ces mécanismes est essentiellement due à l'étude de modèles expérimentaux de la peau. La mobilisation des DCs induite par divers signaux pro-inflammatoires (chimiques, physiques ou biologiques) est liée à l'activité de **2 messagers intermédiaires : TNF- α et IL-1 β** . En effet, après une sensibilité de contact, on observe une forte augmentation du niveau d'expression de l'ARNm de ces deux cytokines (Enk et Katz, 1992). De plus, ces 2 cytokines ne sont pas seulement nécessaires mais aussi suffisantes à la mobilisation puisqu'elles permettent de mobiliser les DCs en absence de tout autre stimulus (Cumberbatch et al., 1997). Les DCs sont retenues par des molécules dans les tissus, par exemple les LCs expriment l'E-cadherine qui permet leur accrochage dans l'épiderme et leurs jonctions avec les kératinocytes (Tang et al., 1993). La rupture de ces jonctions permet la migration et la maturation des DCs avec l'expression concomitante du CCR7 sans augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires (Jiang et al., 2007). D'autre part, le TNF- α , l'IL-1 β et le LPS (lipopolysaccharide) permettent le détachement des DCs en diminuant l'expression de l'E-cadherine (Jakob et Udey, 1998).

Une fois que détachées des cellules du tissu environnant, les DCs doivent **migrer à travers la matrice extracellulaire**. Pour permettre cette migration interstitielle, les DCs vont **exprimer des enzymes protéolytiques** comme **les métalloprotéinases (MMP)**, particulièrement **les MMP-2 et MMP-9** (Ratzinger et al., 2002; Yen et al., 2008). L'activité des MMPs est régulée de façon endogène par des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMP), qui vont bloquer la migration (Ratzinger et al., 2002). Ensuite les DCs vont changer leur répertoire de récepteurs aux chimiokines pour favoriser le chimiotropisme vers les ganglions lymphatiques, notamment ***via* le CCR7 et les ligands CCL19 et CCL21**, comme indiqué précédemment. Chez la souris, le CCL21 existe sous deux isoformes CCL21-ser et CCL21-leu. Tous ces ligands sont exprimés différemment suivant les sites anatomiques : les ligands CCL19 et CCL21-ser sont retrouvés dans le paracortex, les sinus subcapsulaires des ganglions lymphatiques et dans les organes lymphoïdes en général, tandis que le CCL21-leu et CCL21-ser sont localisés dans les voies lymphatiques afférentes issues des organes non lymphoïdes (Vassileva et al., 1999)(Förster

et al., 2008). Ces 2 ligands (CCL19-CCL21) sont exprimés par les cellules endothéliales lymphatiques périphériques et les cellules stromales des ganglions lymphatiques et cette expression est exacerbée par des stimuli pro-inflammatoires comme l'exposition au TNF- α et à l'IL-1 α (Martín-Fontecha et al., 2003). D'autres récepteurs de chimiokines peuvent être impliqués comme **le CXCR4 et son ligand le CXCL12 au niveau des DCs dermales et LCs** (Kabashima et al., 2007).

Les DCs doivent ensuite **traverser l'endothélium des voies lymphatiques afférentes**. Ce mécanisme est encore peu compris mais on pense que les DCs sont capables de s'insérer entre les molécules d'adhésion des jonctions serrées et adhérentes qui lient les cellules épithéliales lymphatiques (Alvarez et al., 2008). D'autre part, les sélectines (E-sélectine), les chimiokines (CCL-5, CCL-20 et CXCL-5) et les molécules d'adhésion (ICAM-1 (en anglais, *InterCellular Adhesion Molecule-1*) et VCAM-1 (en anglais, *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) sont surexprimées par les cellules endothéliales lymphatiques après stimulation cytokinique et la neutralisation des molécules ICAM-1 et VCAM-1 bloque l'adhésion des DCs et leur transmigration à travers l'endothélium lymphatique *in vivo* et *in vitro* (Johnson et al., 2006).

Après inflammation, **le retour à l'état d'équilibre est régulé via la molécule D6**, qui est un récepteur neutralisant les chimiokines, exprimé sur les épithéliums lymphatiques et jouant un rôle essentiel dans le contrôle du niveau des chimiokines inflammatoires dans les tissus (Mantovani et al., 2006).

Une fois la barrière endothéliale lymphatique passée, **les mécanismes de contrôle du transit des DCs à travers la lymphe ne sont pas connus**. Il est fortement probable que les cellules suivent le flux lymphatique passivement qui varie suivant des critères biophysiques, comme la capacité contractile des vaisseaux lymphatiques, les gradients de pression hydrostatique etc. D'autre part, il reste incertain si les DCs suivent des facteurs chimiokiniques ou si elles interagissent avec des structures en forme de rails, comme il a été récemment observé dans les vaisseaux lymphatiques (Johnng et al., 2007). Au niveau des ganglions, les DCs vont rejoindre les zones T et pouvoir interagir avec les cellules T naïves et il est important de souligner que le CCL19 et CCL21, bien qu'ayant un rôle important dans la migration des DCs, sont également favorables pour la maturation et la capture antigénique des DCs (Yanagawa et Onoé, 2003; Marsland et al., 2005).

2. Les récepteurs du non-soi : TLR, RLR et NLR

Les DCs, en tant que sentinelles du système immunitaire, détectent dans leur environnement la présence de pathogènes soit indirectement *via* des facteurs endogènes tels que les cytokines et les chimiokines, qui jouent le rôle d'alerte ou directement *via* la reconnaissance des **motifs moléculaires associés aux pathogènes** (en anglais, *Pathogen associated Molecular Patterns*, **PAMPs**). Cette reconnaissance directe est possible grâce à la présence des **récepteurs reconnaissant ces motifs**, les **PRR** (en anglais, *Pattern Recognition Receptors*) à la surface des DCs.

→ Les TLRs

Les **Toll-like receptor (TLR)** constituent les PRR les plus étudiés. Ils sont apparentés à la protéine Toll, initialement découverte chez la drosophile et impliquée dans la polarisation dorso-ventrale au stade larvaire et dans la réponse contre les bactéries ou les champignons chez l'adulte (Leulier et Lemaitre, 2008). Les TLR sont des protéines transmembranaires de type-I, composées d'une **partie extracellulaire riche en motif LRR** (en anglais, *Leucine-Rich Repeat*), intervenant dans la reconnaissance du pathogènes et d'un **domaine intracellulaire similaire à celui du récepteur de l'IL-1, le domaine TIR** (en anglais, Toll/IL-1 receptor), qui permet la transduction du signal et l'activation des voies de signalisation intracellulaires (Kawai et Akira, 2008).

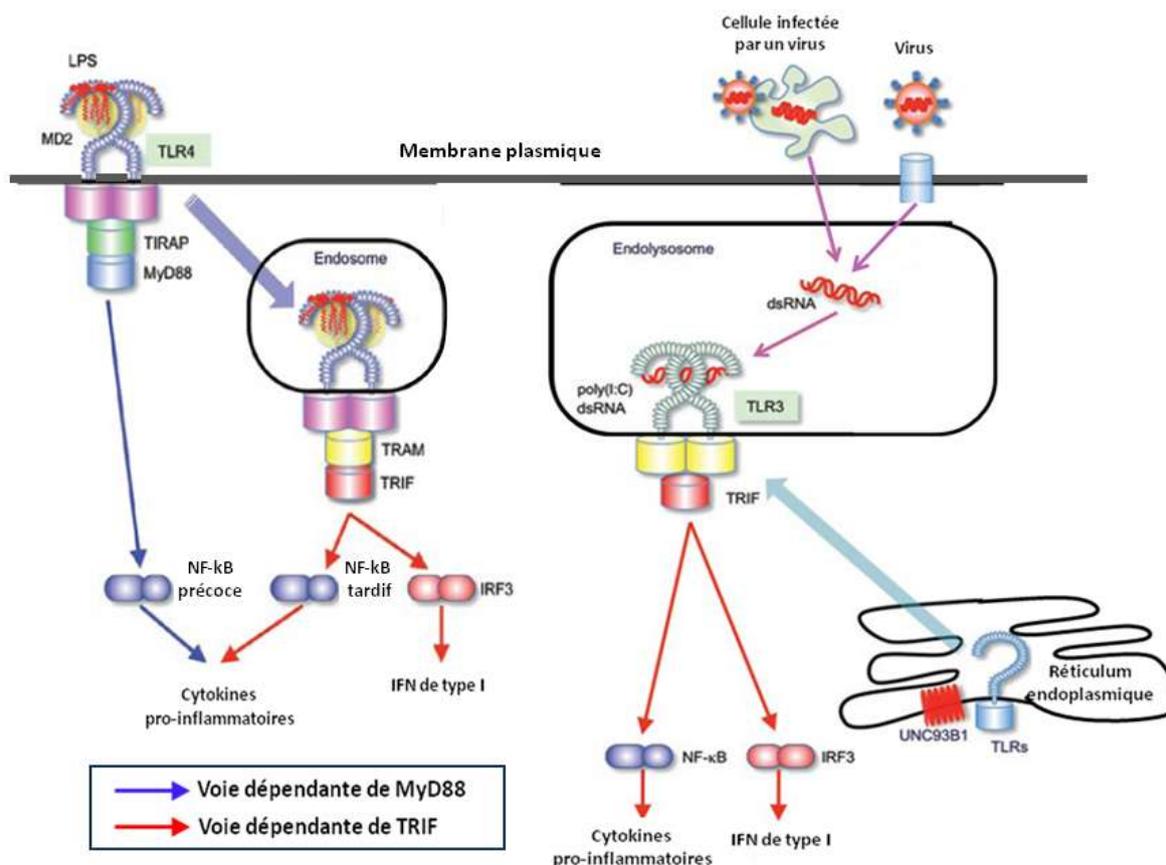
Treize TLRs ont été identifiés chez les mammifères et 12 sont exprimés dans le génome de la souris. Les TLR1 à 9 sont conservés entre l'homme et la souris, alors que le TLR10 est présumé fonctionnel chez l'homme mais pas chez la souris et inversement pour le TLR11 (Takeda et Akira, 2005). Les TLRs reconnaissent des molécules distinctes qui dérivent des différents microorganismes, tels que les virus, les bactéries, les champignons et les parasites. Ils peuvent ainsi être classés suivant le type de ligands qu'ils reconnaissent. Les **TLR1, 2, 4 et 6** reconnaissent **les lipides**. Le TLR4, associé avec ses composantes extracellulaires comme le MD-2 et le CD14, reconnaît le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram-négatives (Poltorak et al., 1998). Le TLR2 forme des hétérodimères avec le TLR1 et le TLR6, ainsi qu'avec des molécules non-TLR, comme le CD36. Ensemble, ils se lient à différents ligands, incluant les peptidoglycanes, les lipopeptides mycoplasmiques, le zymosan fongique et les lipopeptides/lipoprotéines des bactéries Gram positives (Takeuchi et al., 2000)(Takeuchi et al., 2002)(Takeuchi et al., 2001). Les **TLR5 et TLR11** reconnaissent, quant à eux, **les protéines**. Le TLR5 reconnaît la flagelline bactérienne (Hayashi et al., 2001), tandis que le TLR11 reconnaît les bactéries uropathogéniques et une molécule du type profiline du parasite *Toxoplasma gondii* (Yarovinsky et al., 2005)(Zhang et

al., 2004). Ces TLRs sont localisés à la surface des cellules, **une autre catégorie de TLR est localisée dans les endosomes et le réticulum endoplasmique** (Figure 6). Ce sont les **TLR3, 7, 8 et 9** qui reconnaissent **les acides nucléiques**, dérivés des virus et des bactéries. Le TLR3 reconnaît les ARN double-brins, produits par de nombreux virus lors de leur réplication (Alexopoulou et al., 2001). Le TLR7 est sensible aux molécules type imidazoquinoline, aux analogues de la guanosine, aux petits ARN interférents et aux ARN simple brin de divers virus (Hemmi et al. 2002) (Hornung et al. 2005). La fonction immune du TLR8 est encore inconnue chez la souris, bien que chez l'homme, il reconnaisse les mêmes molécules que le TLR7 de la souris (Jurk et al., 2002). Enfin, le TLR9 reconnaît les motifs CpG présents dans les génomes bactériens et viraux et l'hémozoïne, issue de la dégradation de l'hémoglobine des globules rouges par les parasites de la malaria (Lund et al., 2003) (Coban et al., 2005).

Chaque TLR va déclencher des réponses biologiques spécifiques. Par exemple, l'activation des TLR3 et TLR4 génèrent la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1, 6, 12 et le TNF α et une réponse interféron (IFN) de type I, alors que les hétérodimères TLR1-TLR2 et TLR2-TLR6 ainsi que le TLR5 induisent uniquement des cytokines pro-inflammatoires. Cette différence est expliquée par le fait qu'il existe plusieurs adaptateurs possédant des domaines TIR, incluant MyD88, TIRAP (Mal), TRIF et TRAM, qui sont recrutés par les différents TLRs et qui activent différentes voies de signalisations. En effet, MyD88, qui est utilisé par tous les TLRs à l'exception du TLR3 *via* l'adaptateur TIRAP (Kawai et Akira, 2008), active le facteur de transcription NF-kB et les protéines kinases MAPK (en anglais, *mitogen-activated protein kinases*) pour induire les cytokines pro-inflammatoires (Akira et al., 2006). Au contraire, TRIF, recruté par les TLR3 et TLR4 *via* l'adaptateur TRAM, induit d'autres voies de signalisations conduisant à l'activation des facteurs de transcription IRF3, qui induit les réponses interféron de type I, mais active également le NF-kB et induit donc l'induction des cytokines pro-inflammatoires, comme le MyD88 (Kawai et Akira, 2008) (Figure 6).

Ainsi, le TLR4 est le seul TLR à activer ces 2 voies de signalisations dépendantes de MyD88 et de TRIF. Initialement le TLR4 déclenche l'activation précoce de NF-kB et des MAPKs *via* la voie dépendante MyD88 puis le TLR4 est endocyté et maintenu dans les endosomes, où il recrute TRIF et déclenche l'initiation tardive de la voie NF-kB et des MAPK, ainsi que l'activation de l'IRF3 (Kagan et al., 2008) (Figure 6). Le TLR4 active donc en premier lieu la voie dépendante de MyD88 puis celle dépendante de TRIF. Cette activation des 2 voies est nécessaire pour une induction efficace des cytokines pro-inflammatoires, contrairement aux autres TLRs, qui sont capables d'induire la production de ces cytokines soit *via* MyD88 ou soit *via* TRIF (Kawai et Akira, 2010).

Les DCs expriment un panel de récepteurs différent selon le type de DCs en question. Les DCs CD8⁺ spléniques de la souris n'expriment pas l'ARNm du TLR7 et ne répondent pas à la stimulation avec son ligand *in vitro*. Elles montrent d'autre part une plus faible expression du TLR5 que les autres DCs spléniques, mais elles expriment en revanche beaucoup plus fortement le TLR3, qui semblent absent des pDCs spléniques (Edwards et al., 2003). Cette forte expression du TLR3 par les DCs CD8⁺ spléniques est en corrélation avec la fonction décrite précédemment de ces cellules. En effet, ces DCs sont spécialisées dans la phagocytose des cellules mortes ou infectées par des virus et par conséquent sont amenées à être en contact avec les ARN double-brin issus des éléments phagocytés, ligand du TLR3. Cette activation du TLR3 permet d'améliorer la capacité de cross-présentation des DCs CD8⁺ et suggèrent ainsi un rôle du TLR3 dans l'établissement des réponses immunes adaptatives contre les virus n'infectant pas directement les DCs (Schulz et al., 2005). La localisation des DCs va également influencer l'expression des TLR par celles-ci. Ainsi, les DCs CD11b⁺ de la *lamina propria* de l'intestin vont exprimer fortement le TLR5, qui reconnaît les bactéries à flageline, comme précédemment indiqué. En réponse à la flageline, les DCs CD11b⁺ vont induire la différenciation des cellules T CD4⁺ en cellules Th17 et de type 1 (Th1) et les cellules B naïves en plasmocytes produisant les immunoglobulines A (Uematsu et al., 2008). Au niveau de la vessie et des reins, le TLR11 reconnaissant les bactéries uropathogéniques est retrouvé fortement exprimé (Kawai et Akira, 2010).



dsRNA : double-stranded Ribonucleic Acid (ARN double-brin)
 poly (I :C) : acide polyinosinique – polycytidilique

Figure 6. Reconnaissance des PAMPs par le TLR4, en surface cellulaire et le TLR3 intracellulaire. La formation d'un récepteur multimérique composé de 2 copies de TLR4-MD2-LPS transmet initialement des signaux pour la phase d'activation précoce de NF-kB grâce au recrutement des adaptateurs TIRAP et MyD88, qui contiennent un domaine TIR. Finalement, les complexes TLR4-MD2-LPS sont internalisés *via* une endocytose dépendante de la dynamine et retenus dans les endosomes, où ils déclenchent une nouvelle transduction du signal, *via* le recrutement des adaptateurs TRAM et TRIF, qui conduit à la phase d'activation tardive de NF-kB et de IRF3. Ces deux voies permettent la production de cytokines inflammatoires et d'interféron de type I après l'engagement du TLR4 par le LPS. Le TLR3, tout comme notamment les TLR7 et TLR9, se trouve à l'état de repos dans le RE. Sous l'engagement du TLR3 par son ligand (les ARN double brin dérivés des virus ou des cellules infectées par un virus), le TLR3 va interagir avec UNC93B1, une protéine du RE nécessaire à sa translocation dans les compartiments endolysosomiaux. Un homodimère de TLR3 est formé par la fixation d'un ARN double brin et active la voie dépendante de TRIF pour induire la production de cytokines pro-inflammatoires et de l'interféron de type I. D'après Kawai et Akira, Nature Immunol., 2010.

Enfin, l'activation de la plupart des TLRs conduit à une sécrétion d'IL-12p70 par les DCs et à une différenciation des cellules T CD4+ en cellules Th1, produisant de l'IFN γ . Cela dit, l'activation des hétérodimères formés par le TLR2 (TLR2-1 et TLR2-6) induit une forte expression d'IL-10 et relativement peu d'IL-12p70, ce qui induit des différenciations vers les réponses Th2-Tregs (Manicassamy et Pulendran, 2009). Notamment, après stimulation du TLR2 avec du zymosan, un dérivé de la paroi cellulaire des levures, l'induction de cellules Tregs a été démontrée *via* la sécrétion de fortes concentrations d'IL-10 et l'activation de la voie de synthèse de l'acide rétinoïque par les DCs spléniques de souris (Manicassamy et al., 2009). L'étude de la synergie des réponses induites par l'activation de plusieurs TLRs reflète aussi un rôle régulateur du TLR2. En effet, l'utilisation du vaccin de la fièvre jaune 17D (YF-17D), qui active plusieurs TLRs (TLR2, 7, 8, 9), dans des souris déficientes pour MyD88 ou TLR2 montre que les différents TLRs agissent de manière distincte sur la balance des réponses cellulaires T. Ainsi, les souris déficientes pour MyD88 montrent un défaut dans le développement des réponses T de type Th1, alors que les souris déficientes pour le TLR2 auront une réponse T de type Th1 et cytotoxique exacerbée (Querec, 2006). D'autres activations simultanées de TLRs (TLR3 et TLR9 ou TLR2/6 et TLR9) auront un effet amplificateur sur la sécrétion des cytokines et l'expression de certaines molécules, notamment quand les TLRs en question induisent simultanément les voies dépendantes de MyD88 et celles dépendantes de TRIF. Ce n'est pas le cas quand les DCs sont stimulées par le TLR2/6 et TLR9, déclenchant uniquement la voie dépendante de MyD88 (Zhu et al., 2008).

→ Les RLRs

Un second groupe de PPR est impliqué dans la reconnaissance des acides nucléiques viraux : ce sont **les RLR** (en anglais, Retinoic acid-Inducible Gene (*RIG*)-*I-like receptor*), qui sont des hélicases d'ARN situées dans le cytoplasme et incluent RIG-I, Mda5 (Melanoma differentiation-associated gene-5) et LGP2. Les récepteurs RIG-I et Mda contiennent 2 domaines CARD (Caspase Recruiting Domain) permettant la transmission du signal d'activation, alors que le LGP2 n'en a pas. Ces récepteurs interagissent avec les ARN viraux et induisent la transcription de l'IFN de type I et des cytokines pro-inflammatoires *via* un adaptateur IPS-1 (Interferon beta promoter stimulator-1), localisé dans la mitochondrie qui active comme le TLR3 (*via* TRIF) l'expression des facteurs de transcriptions NF-kB et IRF3 (Kawai et Akira, 2008). Ainsi, **la sécrétion des IFN de type I suite à une infection virale est induite par deux familles de récepteurs.**

→ **Les NLRs**

Ce groupe de PPR regroupe aussi des récepteurs cytosoliques, nommés **les NLR** (en anglais, Nucleotide binding and Oligomerisation Domain (*NOD*)-like receptor). Ce groupe comprend les NODs, les NALPs, l'IPAF (IL-1 β -converting enzyme-protease activating factor), les NAIPs (Neuronal Apoptosis Inhibitor factor) et le transactivateur des molécules CMH-II (CIITA). Contrairement aux TLRs, les NLRs sont des protéines solubles du cytoplasme qui détectent la présence de pathogènes intracellulaires. Chez la souris, 34 gènes ont été répertoriés. Les ligands pour ces récepteurs sont, pour la plupart, similaires à ceux des TLRs : on retrouve la flageline bactérienne, notamment ligand des NAIPs, des peptidoglycanes comme le dipeptide acide γ -D-glutamyl-meso-dia-minopimelic ou le dipeptide muramyl, ligand respectif des récepteurs NOD1 et NOD2. Les NALPs ont pour ligand, entre autre, le LPS, les ARN viraux et bactériens mais également le dipeptide muramyl. Ces récepteurs possèdent 3 domaines : un **domaine LRR**, fixant le ligand et un **domaine NACHT**, permettant l'oligomérisation des NLRs, qui sont commun à tous les NLRs et un **domaine effecteur**, **CARD pour les NODs**, **PYD (Pyrin Domain) pour les NALPs et IPAF** et **BIR (Baculoviral IAP repeat) pour les NAIPs** (Fukata et al., 2009). Ces différents domaines effecteurs vont donner lieu à la transduction du signal grâce soit à la formation de plateforme de haut poids moléculaire activant la caspase-1, appelée **inflammasome**, soit à l'activation de NF-kB par les NODs. L'activation de la caspase-1 va permettre la maturation de l'IL-1 β et l'IL-18 (dotés de puissantes activités pro-inflammatoires) *via* le clivage de précurseurs IL-1 β et IL-18, produits de l'activation de NF-kB par les TLR (Schroder et Tschopp, 2010).

Ainsi, cette importante coopération entre la signalisation des TLRs et des NLRs permet la surveillance extracellulaire et intracellulaire des pathogènes.

B. Capture antigénique

Comme nous l'avons déjà vu, les DCs représentent des cellules hautement spécialisées dans la présentation antigénique et elles utilisent plusieurs stratégies pour capturer les antigènes, soit par des mécanismes dépendant de l'actine (macropinocytose et phagocytose, différent par la taille de la particule endocytée), soit par des mécanismes dépendant de la clathrine ou encore dépendant de la caveoline (endocytose médiée par récepteur) (Xiang et al., 2006; Wilson et Villadangos, 2005)(Figure 7).

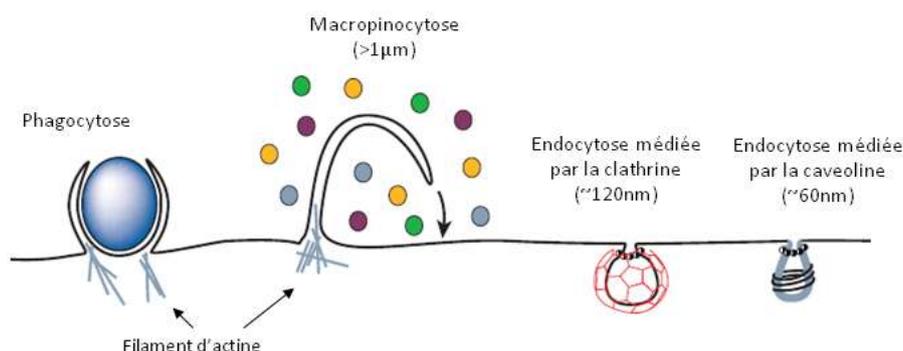


Figure 7. Les différents mécanismes d'endocytose.
D'après Conor et Schmid, Nature, 2003.

1. Macropinocytose

La macropinocytose est constitutive dans les DCs immatures et n'engage aucun récepteur spécifique d'endocytose. Ce processus permet à la cellule de prélever des bactéries ou de larges particules présentes dans le milieu extracellulaire et il a été établi que la DC immature pouvait internaliser l'équivalent de son volume en 60 min (Xiang et al., 2006; Sallusto et al., 1995). La régulation du volume ingéré est contrôlée grâce à l'expression de plusieurs membres de la famille des aquaporines, qui sont des canaux membranaires qui facilitent l'élimination des excès d'eau à travers la membrane endosomale (Wilson et Villadangos, 2005). L'internalisation de grandes quantités de matériel extracellulaire suivi de l'élimination de l'excès d'eau permet une concentration très efficace des macromolécules dans les compartiments endosomaux des DCs immatures, qui jouent ainsi leur rôle de sentinelles (Sallusto et al., 1995).

2. Endocytose médiée par des récepteurs

→ **Dépendante des clathrines**

Ce mécanisme (le plus classiquement décrit) permet l'internalisation de molécules reconnues par des récepteurs membranaires spécifiques, qui déclenchent ensuite la formation de cavité recouverte d'une protéine cytosolique, associée en trimère : la clathrine. Les récepteurs membranaires lient la clathrine, grâce à des protéines adaptatrices qui interagissent avec leur domaine cytoplasmique. Une fois la vésicule internalisée, la clathrine se sépare du récepteur et la vésicule va intégrer les voies endocytaires intracellulaires que nous verrons plus tard. Une partie des récepteurs séparés de leur ligand peut être recyclée à la surface cellulaire (Roth, 2006). Les particules ingérées ont une taille inférieure à 150nm et incluent les complexes immuns antigènes-anticorps *via* les récepteurs des fragments constant des Ig (Fc récepteurs) et l'ovalbumine *via* le récepteur au mannose (Autenrieth et Autenrieth, 2009; Ukkonen et al., 1986)

→ **Dépendante de la cavéoline**

Ce mécanisme permet l'endocytose de particule entre 50-80nm grâce à la formation de caveolae, qui sont des invaginations de la membrane plasmique en forme de flasque recouverte de caveoline-1. Ce type d'endocytose est dépendante de récepteurs et des radeaux lipidiques (en anglais, lipid raft), qui représentent des microdomaines riches en shingolipides et concentrés en molécules de signalisation associées à la membrane. Ces caveolae sont impliqués dans la capture de toxines bactériennes, telles que la toxine tétanique et du choléra et de certains virus non enveloppés (virus simien 40, virus polyoma)(Norkin, 2001; Parton et Lindsay, 1999). Cela dit, le fait que l'endocytose médiée par les caveolae soit un mécanisme constitutif de capture endocyttaire non négligeable quantitativement, est encore controversé, étant donné qu'au repos les caveolae sont des structures hautement immobiles et que leur endocytose est régulée négativement par la cavéoline-1 les recouvrant (Hommelgaard et al., 2005; Le et al., 2002; Thomsen et al., 2002). D'autre part, une interaction entre HO-1 et la cavéoline a été décrite chez les macrophages et sera décrite dans la partie 2 (II-b) de cette introduction.

3. Phagocytose

Elle permet l'internalisation de bactéries et de larges particules tels que des corps apoptotiques ($>0,5\mu\text{m}$) et se distingue de la macropinocytose par l'implication de récepteurs spécifiques (Xiang et al., 2006). Comme la macropinocytose, elle est restreinte à des cellules

spécialisées comme les macrophages et les DCs. Les récepteurs impliqués dans la phagocytose sont entre autres les Fc récepteurs (ex : FcγR) et les récepteurs des protéines du complément (les principaux sur la DC : CR3 et CR4), qui reconnaissent les composants de la voie humorale, à savoir, le complément ou les anticorps recouvrant les microorganismes : c'est ce que l'on appelle l'opsonisation. L'activation des récepteurs phagocytaires génère une vague d'évènements de signalisation qui permet un important remodelage de la surface cellulaire au site d'internalisation, avec réorganisation du cytosquelette (actine principalement) concomitante avec l'extension de pseudopodes (Desjardins, 2003). Après leur formation, les phagosomes internalisés vont entamer un processus de maturation que je décrirai plus tard.

4. Autophagocytose

L'autophagie (ou macroautophagie) est employée par les cellules pour dégrader ses propres organites intracellulaires détériorés ou obsolètes, des protéines et des pathogènes mais est également important dans l'apport de nutriments à la cellule lorsque ceux-ci font défaut dans l'environnement cellulaire. Ainsi, ce processus joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Ce mécanisme nécessite la formation d'autophagosomes, qui sont des vésicules à double membrane d'origine non lysosomale responsables de la distribution du matériel cytoplasmique aux voies endocytaires. Deux autres voies d'autophagies ont été décrites : la microautophagie, qui correspond à la capture du cytoplasme par invagination de la membrane lysosomale et l'autophagie médiée par les protéines chaperones, correspondant à l'import et à la dégradation de protéines cytosoliques solubles par translocation directe à travers la membrane lysosomale grâce aux protéines chaperones (Xiang et al., 2006). L'autophagie est sous le contrôle d'une trentaine de gènes (en anglais, autophagy-related genes, ATG). Notamment, ATG12 et ATG8 (LC3 chez les mammifères) sont impliqués dans la formation et l'expansion des membranes de l'autophagosome (Vyas et al., 2008). D'autre part, l'autophagie semble constituer un mécanisme important dans les réponses immunitaires à plusieurs niveaux : dans l'élimination de pathogènes, tels que *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella enterica serovar typhimurium* en les ciblant directement dans le cytosol ou dans les phagosomes des macrophages (Birmingham et al., 2006; Gutierrez et al., 2004) et dans le développement de l'autoimmunité notamment chez les patients atteints de la maladie de Crohn (Massey et Parkes, 2007).

5. Les récepteurs de capture antigénique

Les récepteurs de capture antigénique regroupent plusieurs catégories de récepteurs dont les récepteurs de type lectine C, les récepteurs « scavengers » (d'épuration), les récepteurs des fragments constants des Ig (récepteur Fc) et les récepteurs du complément, ces deux derniers impliqués dans la phagocytose et ayant déjà été évoqué plus haut ne seront pas détaillés.

Les récepteurs de type lectine C lient les sucres grâce à un ou plusieurs domaines de reconnaissance des carbohydrates (en anglais, carbohydrate recognition domain, CRD) et peuvent être subdivisés en 4 groupes (Cambi et al., 2005):

- les récepteurs transmembranaires de type I qui regroupent le Macrophage Mannose Récepteur (MMR) (CD206) et le DEC205 (CD205). Le MMR est sécrété par les DCs et possède un domaine N-terminal riche en cystéine pouvant se lier aux cellules lymphoïdes de la zone marginale. Ainsi, le MMR pourrait être impliqué dans le transport d'antigènes mannosylés des sites de l'inflammation vers les follicules des organes lymphoïdes. D'autre part, ce domaine riche en cystéine pourrait également participer au trafic cellulaire des cellules portant le MMR par interaction de celui-ci avec les macrophages ou les cellules B (Figdor et al., 2002). Le DEC205 (CD205), quant à lui, possède, dans sa partie cytoplasmique, des séquences qui régulent son trajet intracellulaire et son recyclage en surface (Figdor et al., 2002). Ces 2 récepteurs possèdent des motifs tyrosines qui permettent leur internalisation *via* la clathrine, mais sont aussi impliqués dans l'internalisation des pathogènes par phagocytose par reconnaissance directe des mannanes, notamment sur la paroi cellulaire des levures (Xiang et al., 2006).

- les récepteurs transmembranaires de type II qui regroupent, entre autre, DC-SIGN (en anglais, *Dendritic-cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin* (CD209)), la langerine (CD207) et DCIR, ces deux derniers étant impliqués dans la présentation antigénique, comme évoqué précédemment.

- les récepteurs sécrétés comme les collectines, comprenant les protéines surfactants A et D (SPA et SPD) et la protéine de liaison au mannose (MBL). SPA lie les carbohydrates des mycobactéries et le MBL lie les mannans des pathogènes, ces liaisons seront reconnus par le récepteur SPR120 et C1q respectivement (Tenner et al., 1995; Chroneos et al., 1996), et permettront l'opsonisation des cibles par phagocytose. D'autre part, le MBL et la protéine du complément C1q sont capables de lier les cellules apoptotiques et d'initier leur phagocytose *via* la fixation de la calréticuline qui lie à son tour le récepteur endocyttaire CD91 (Ogden et al., 2001).

- les récepteurs de type NK (natural killer) dans lesquels on retrouve le récepteur Dectin-1, également cités précédemment pour son rôle dans la présentation antigénique.

En plus de leur implication dans les mécanismes d'endocytose, la plupart de ces récepteurs permettent d'autres fonctions aux DCs, comme l'interaction avec les cellules T (DC-SIGN, Dectin-1), le trafic cellulaire (MMR, DEC205). D'autre part, MMR et DC-SIGN peuvent aussi être sécrétés et pourraient donc jouer un rôle dans la neutralisation des antigènes (Figdor et al., 2002), semblable à celui des Ig et des protéines du complément.

Les **récepteurs « scavenger »** englobent un large panel de récepteurs très différents structurellement, initialement regroupés ensemble pour leur capacité à lier les lipoprotéines de faibles densités oxydées ou acétylées. Un des récepteurs scavengers impliqué dans la présentation antigénique est le récepteur LOX-1 (en anglais, lectin-like oxidized Low-density lipoprotein receptor 1). Delneste et al ont démontré que LOX-1 intervient *in vitro* dans la cross-présentation par les DCs de l'ovalbumine couplée à la protéine chaperonne hsp70. Par ailleurs, dans un modèle murin de tumeur exprimant l'ovalbumine, l'injection d'un anticorps anti-LOX-1 couplé à l'ovalbumine prévient la croissance de ces tumeurs murines. Ainsi, *in vivo*, le ciblage des antigènes tumoraux à LOX-1 induit une réponse cytotoxique anti-tumorale protectrice (Delneste et al., 2002).

C. Apprêtement antigénique

1. Les voies endocytaires après l'internalisation des antigènes.

Les endosomes (suite à l'endocytose médiée par récepteur) ou les phagosomes formés à la suite de la capture antigénique vont échanger leur matériel avec initialement les endosomes précoces puis les endosomes tardifs et enfin les lysosomes pour former les endolysosomes ou les phagolysosomes. Ce transfert progressif, à la fois des membranes et des constituants de la lumière des endosomes/lysosomes se produit pendant des étapes de fusion, qui sont très hiérarchisées. Ces étapes de fusion impliquent tout d'abord RAB5, une protéine cytosolique à activité GTPase, qui se lie aux membranes lorsqu'elle est sous la forme GTP. Le recrutement de RAB5 permet la fusion avec d'autres structures positives pour RAB5. RAB5 permet indirectement le recrutement d'EEA1, qui facilite la fusion avec l'endosome précoce. RAB5 permet aussi des interactions avec des endosomes de recyclage positifs pour RAB4 ou RAB11, ce qui permet le recyclage en surface des récepteurs, comme précédemment évoqués. Ensuite RAB5 est remplacé par RAB7 : c'est le phagosome ou endosome tardif. RAB7 permet ensuite l'interaction avec des protéines lysosomales, la fusion avec le lysosome et l'acquisition des marqueurs lysosomaux LAMP-1 et LAMP-2. Tous ces mécanismes de fusion sont assez similaires après l'endocytose médiée par

récepteur et la phagocytose, même si quelques différences sont notées, notamment dans la régulation de l'activité des GTPases (Kinchen et Ravichandran, 2008).

En ce qui concerne les macrophages et les neutrophiles, la maturation des phagosomes et des lysosomes se caractérise également par une forte acidification (pH<5 pendant plusieurs heures) des vésicules et l'acquisition de protéases. Cette rapide acidification est liée au recrutement d'une pompe à protons, la V-ATPase de manière exponentielle au niveau de la membrane du phagosome. Cette acidification permet l'activation des protéases et une dégradation protéolique accrue. Cette maturation phagosomale est en adéquation avec la fonction des macrophages et des neutrophiles, dont la fonction primaire est la destruction totale des antigènes, plutôt que la présentation des antigènes (Savina et Amigorena, 2007). Or, la DC est une CPA professionnelle et la nécessité de préserver les épitopes est incompatible avec l'environnement très acide et fortement protéolytique observé dans les compartiments lysosomaux. Plusieurs études ont permis de comprendre les mécanismes développés par la DC pour préserver les épitopes d'intérêts d'une dégradation trop importante. Tout d'abord, la DC exprime un plus faible niveau de protéases lysosomales, dont la majorité sont des cystéines protéases, (telles que les cathepsines S, B, H et L), des aspartates protéases, (telles que les cathepsines D et E et l'asparagine endopeptidase (AEP)) que son homologue macrophagique (Delamarre et al., 2005). Cette plus faible expression des protéases par la DC est liée au fait d'un recrutement moindre de ces protéases au niveau du phagosome en comparaison du recrutement observé chez les macrophages (Lennon-Duménil et al., 2002). D'autre part, plusieurs études ont montré que le pH endosomal et phagosomal de la DC était beaucoup moins acide que dans les macrophages. Ceci est la conséquence de deux évènements qui sont propres aux DCs : 1/ l'assemblage incomplet de la partie cytosolique de la V-ATPase dans les DCs immatures (Trombetta et al., 2003) et 2/ le recrutement au niveau du phagosome *via* Rab27a d'un système d'alcalinisation absent des macrophages : la NADPH oxydase (Nicotinamide Adenosine Dinucleotide Phosphate oxydase) (Jancic et al., 2007; Savina et al., 2006). La NADPH oxydase catalyse la production d'anion superoxide (O_2^-) à partir d'oxygène. La production de ces radicaux libres va permettre la production de peroxyde d'hydrogène via la consommation intraphagosomale des protons générés par la V-ATPase et donc la stabilisation du pH phagosomal de la DC (Savina et Amigorena, 2007). Par conséquent, les épitopes sont préservés pour la présentation antigénique par dégradation protéolytique contrôlée. La NADPH oxydase pourrait avoir aussi une autre conséquence biologique au regard des réactifs oxygénés (ROS) qu'elle produit. En effet, au-delà de la régulation du pH phagosomal, la faible production en continu de ROS dans les endosomes et phagosomes pourrait être à l'origine d'une modification moléculaire de la conformation des antigènes par

oxydation, qui pourrait affecter la sensibilité de la protéine aux différentes protéases (Amigorena et Savina, 2010).

L'activation des TLRs semble aussi être impliquée dans la régulation de la maturation du phagosome des macrophages, bien que ces données soient controversées. En effet, l'activation des TLRs par des bactéries régule leur phagocytose, ainsi que la cinétique de maturation du phagosome, contrairement aux corps apoptotiques imitant les voies non inflammatoires. Deux modes de maturation du phagosome sont observés : une maturation induite ou accélérée par les TLR et une maturation constitutive indépendante des TLRs (Blander et Medzhitov, 2004). Ce signal émanant du TLR doit être spatialement confiné dans les phagosomes, puisque l'addition exogène de LPS ou la phagocytose simultanée de bactéries ne sont pas suffisantes pour induire une maturation du phagosome contenant des corps apoptotiques (Blander, 2008). Cela dit, d'autres études, basées sur l'analyse de la cinétique en temps réel de l'acidification du phagosome et des fusions phagosome-lysosome démontrent que la maturation des phagosomes n'est pas dépendante de l'activation des TLR2 et TLR4 (démonstré par l'utilisation de macrophages déficients pour le TLR2 ou le TLR4), mais plutôt serait dépendante de la voie MyD88 : puisque les macrophages déficient pour MyD88 montrent une diminution de la fusion phagosome-lysosome comparée aux macrophages normaux indépendamment de la présence ou de l'absence d'un agoniste de TLR (Yates et Russell, 2005). D'autre part, leurs expériences montrent que le LPS influe aussi sur la fusion phagosome-lysosome quelque soit le type de macrophages utilisés (MyD88 déficient ou normaux). Ainsi, le LPS aurait la capacité de moduler la maturation du phagosome indépendamment de la stimulation du TLR, *via* l'engagement d'autres structures liant le LPS (Russell et Yates, 2007). Enfin, l'engagement du TLR est associé au recrutement de protéines autophagosomales au niveau du phagosome macrophagique. En effet, la translocation des marqueurs autophagosomaux LC3 et beclin-1 dans la membrane phagosomale est reportée durant les 1ères étapes de la phagocytose en présence de ligand de TLR. Cependant, cette translocation au phagosome n'est pas associée à la formation de structures à double-membrane (ce phénomène est donc distinguable de l'autophagie conventionnelle), mais est associée avec la fusion du phagosome au lysosome et une rapide acidification du phagosome. D'autre part, une survie accrue de la bactérie phagocytée, en l'occurrence, *Saccharomyces cerevisiae*, est observée en cas de non-translocation de ces protéines autophagosomales (Sanjuan et al., 2007). Ces effets observés liés aux ligands de TLR sont indépendants de MyD88, contrairement aux études précédentes. Cela dit, la fonction exacte du recrutement de ces protéines de l'autophagie au niveau du phagosome reste encore à déterminer même s'il se pourrait que ce phénomène affecte l'apprêtement et

la présentation antigénique ou encore la sélection des cellules T au niveau du thymus, comme nous le verrons ci-après.

2. La voie de présentation antigénique *via* le CMH de classe I

Les molécules du CMH de classe I permettent la présentation antigénique aux lymphocytes T CD8+ de peptides dérivés de protéines dégradées dans le cytosol principalement, qui pour la plupart des DCs correspondent aux protéines endogènes, c'est-à-dire produites par la DC elle-même. Cette voie permet donc l'induction de réponses immunitaires cytotoxiques. Les protéines endogènes peuvent être d'origine virale ou bactérienne si la DC est infectée ou refléter une transformation cellulaire de type tumorale (Jensen, 2007). Les molécules du CMH-I sont composées d'une chaîne lourde α et d'une chaîne invariante, la β 2-microglobuline. L'assemblage de ces deux chaînes est médiée grâce à la protéine chaperonne calnexine au niveau du réticulum endoplasmique (RE) (Jensen, 2007). Les événements de la biosynthèse des complexes CMH-I-peptides peuvent être résumés en 6 étapes, comme le décrit la Figure 8.

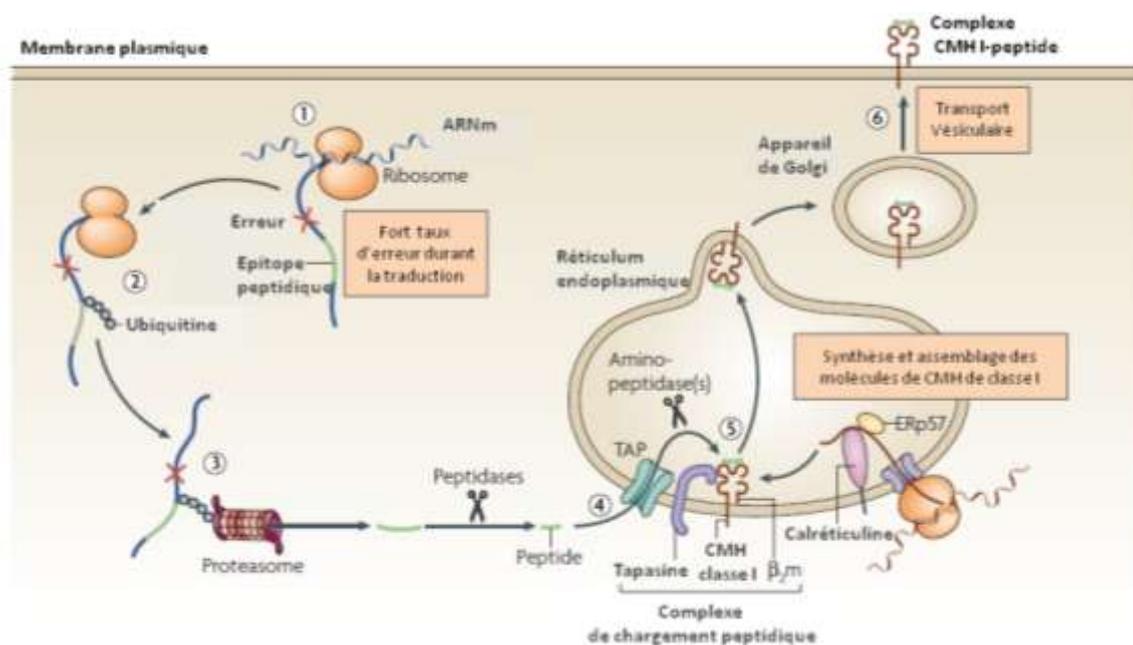


Figure 8. La voie de présentation antigénique *via* les molécules du CMH-I.
D'après Vyas et al, Nature Immunol., 2008.

La première étape (1, Figure 8) correspond à l'acquisition d'antigènes provenant de protéines contenant des erreurs (par exemple, une erreur d'incorporation des acides aminés ou une terminaison précoce) ou de protéines dérivant de pathogènes présents dans le cytosol. Ces protéines sont ensuite ubiquitinylées pour permettre leur dégradation (2, Figure 8), puis sont transférées vers le protéasome qui les dégrade en peptides (3, Figure

8). Les peptides ainsi générés sont ensuite transportés vers le RE par le transporteur associé au complexe d'apprêtement antigénique, TAP (en anglais, Transporter associated with Antigen Processing complex) (4, Figure 8). Ce complexe de chargement peptidique comprend également la tapasine, la calréticuline et ERp57 et est assemblé aux molécules de CMH-I dans le RE après relargage de la calnexine. Il permet de faciliter le chargement des peptides sur les molécules du CMH-I (5, Figure 8) et de fournir le « contrôle de qualité » nécessaire à l'export de complexe CMH-I-peptide en surface (6, Figure 8) (Vyas et al., 2008; Jensen, 2007). Notamment, la tapasine semble avoir un rôle primordial dans le contrôle des complexes CMH-I-peptide, non seulement en aidant au chargement des peptides sur le CMH-I mais aussi en retenant les complexes CMH-I-peptides instables au niveau du RE ou en récupérant les complexes chargés avec un peptide sous-optimal échappés du RE (Howarth et al., 2004; Paulsson et al., 2006). Les peptides transférés dans le RE par TAP subissent également des modifications finales grâce aux aminopeptidases du RE (ERAP, en anglais endoplasmic reticulum aminopeptidase) qui jouent un rôle important dans l'édition des peptides (Serwold et al., 2002; York et al., 2002). Au cours de la maturation des DCs, la synthèse et la demi-vie des molécules de CMH-I sont augmentées mais le renouvellement des molécules de classe I en surface est continu dans les DCs matures (Rescigno et al., 1998), contrairement à ce qui est observé pour les molécules de classe II, comme nous le verrons dans la partie suivante.

3. La voie de présentation *via* le CMH de classe II

Le but de la présentation antigénique par la voie des molécules du CMH-II est de présenter les antigènes exogènes (provenant du milieu extracellulaire) aux lymphocytes T CD4+.

Pour ce faire, la DC synthétise les chaînes α et β des molécules du CMH-II au niveau du RE. Les dimères $\alpha\beta$ sont ensuite associés à la chaîne invariante Ii (CD74) (Cresswell, 1996), dont la région CLIP est insérée au niveau du site de liaison des peptides pour permettre la protection de ce site durant le trafic des molécules du CMH-II dans les compartiments endocytaires et stabiliser les dimères $\alpha\beta$. La queue cytoplasmique de la chaîne Ii comprend un motif de tri qui permet de délivrer les complexes $\alpha\beta Ii$ directement au niveau des endosomes précoces à partir du golgi ou après un passage transitoire en surface cellulaire. Une fois dans les compartiments endocytaires, les complexes $\alpha\beta Ii$ vont subir une maturation par la dégradation de la chaîne invariante Ii. La chaîne Ii est d'abord dégradée en Iip10, qui est ensuite dégradée par la cathepsine S en CLIP (Villadangos et al., 1999). Enfin, la molécule chaperonne H2-DM va permettre l'échange entre CLIP et les peptides antigéniques générés dans les compartiments endocytaires après internalisation des

antigènes exogènes (Wilson et Villadangos, 2005). Les complexes CMH-II-peptides, une fois formés, sont ensuite exportés en surface cellulaire (Figure 9).

L'expression des molécules du CMH-II à la surface des DCs varie en fonction de leur état de maturation. En effet, comme précédemment évoqué, la maturation des DCs provoque une augmentation des molécules de co-stimulation ainsi que des molécules de CMH-II. Un 1^{er} modèle suggère que l'augmentation des molécules du CMH-II à la membrane après stimulation est régulée par le taux de protéolyse de la chaîne invariante Ii *via* la cathepsine S suivi de la liaison des peptides aux molécules CMH-II nouvellement synthétisées dans les endosomes (Blum et Cresswell, 1988; Pierre et Mellman, 1998). En effet, l'activité de la cathepsine S est inhibée dans les DCs immatures par la cystatine C, empêchant ainsi la protéolyse de Ii et conduisant à l'accumulation de complexes $\alpha\beta$ Ii non fonctionnels dans les endo-lysosomes (Loss et Sant, 1993). L'activation de la DC diminue l'expression de la cystatine C et favorise ainsi l'activité de la cathepsine S et la dégradation de la chaîne Ii. Le fait d'empêcher la dégradation de la chaîne Ii est connu pour inhiber l'expression des molécules du CMH-II en surface et expliquerait les différences observées entre les DCs immatures et matures. Cela dit, Villadangos et al. ont remis en cause ce modèle en démontrant que les différences d'expression des molécules de CMH-II durant l'action des DCs étaient régulées par les taux de macropinocytose et de recyclage des molécules de CMH-II différents entre l'état immature et mature (Villadangos et al., 2001), indépendamment de la protéolyse de la chaîne invariante Ii. Ainsi, dans ce 2^{ème} modèle, les DCs immatures génèrent constitutivement des complexes CMHII-peptides, qui sont transitoirement et peu exprimés en surface cellulaire, puis internalisés et dégradés. Suite à l'activation, la synthèse de nouvelles molécules de CMH-II est transitoirement accentuée et le recyclage des complexes de surface est diminué. Cela cause une accumulation des complexes CMH-II-peptides nouvellement synthétisés en surface. La synthèse de nouvelles molécules de CMH-II est ensuite freinée, ce qui permet à la DC de présenter un panel de complexes CMH-II-peptides de longue durée de vie, même si les antigènes étrangers ont été éliminés par le mécanisme protéolytique de l'apprêtement antigénique (Wilson et Villadangos, 2005). Ce phénomène est à double tranchant puisque la DC devient incapable de renouveler son répertoire antigénique.

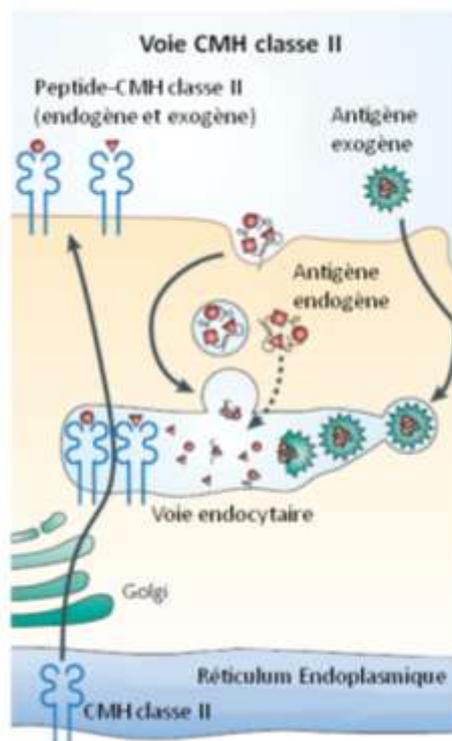


Figure 9. La voie de présentation antigénique *via* les molécules de CMH-II.

D'après Villadangos et Schnorrer, *Nature Immunol.*, 2007.

Comme la Figure 9 l'indique, les antigènes endogènes peuvent aussi être présentés sur les molécules du CMH-II. Ce mécanisme est intimement lié à l'autophagie. En effet, la présentation d'antigènes viraux issus du virus d'Epstein-Barr exprimés à des niveaux physiologiques (Paludan et al., 2005), mais aussi des antigènes du soi (Brazil et al., 1997), tumoraux (Dörfel et al., 2005) ou des antigènes cytosoliques modélisés (épitopes de la néomycine phosphotransférase II) (Nimmerjahn et al., 2003) sur les molécules de CMH-II est dépendante du recyclage des protéines cytosoliques par autophagie. Cela dit, la façon dont la capture antigénique influence la balance entre la présentation des antigènes endogènes versus celle des antigènes exogènes n'est pas connue, même si une étude montre brièvement que les antigènes exogènes ne rentrent pas en compétition avec les antigènes endogènes pour la présentation antigénique restreinte aux CMH-II dans les DCs matures (Zwickey et al., 2006). La présentation des antigènes endogènes pourrait être affectée par l'état de maturation des DC, puisque l'autophagie est accentuée après une stimulation des TLR4 et 7 chez le macrophage (Xu et al., 2007; Delgado et al., 2008). Bien que l'autophagie soit clairement impliquée dans la voie de présentation du CMH-II, des travaux supplémentaires sont requis pour comprendre dans quelle mesure l'autophagie influence le répertoire de peptide restreint aux CMH-II durant la réponse immune contre les pathogènes.

4. La voie de cross-présentation : la réunion des deux voies.

La cross-présentation a été pour la première fois décrite en 1976 par Bevan (Bevan, 1976). Il montra que des lymphocytes T cytotoxiques pouvaient être générés *in vivo* en réponse à un antigène exogène. Ainsi, la DC capture un antigène exogène et le présente à sa surface sur des molécules de CMH-I. On parle de cross-priming si la cross-présentation est suivie de l'activation du lymphocyte T CD8+. La Figure 10 montre la comparaison des 2 voies de présentation antigénique sur les molécules du CMH-I : la présentation directe des antigènes endogènes (à gauche) et la cross-présentation des antigènes exogènes (à droite).

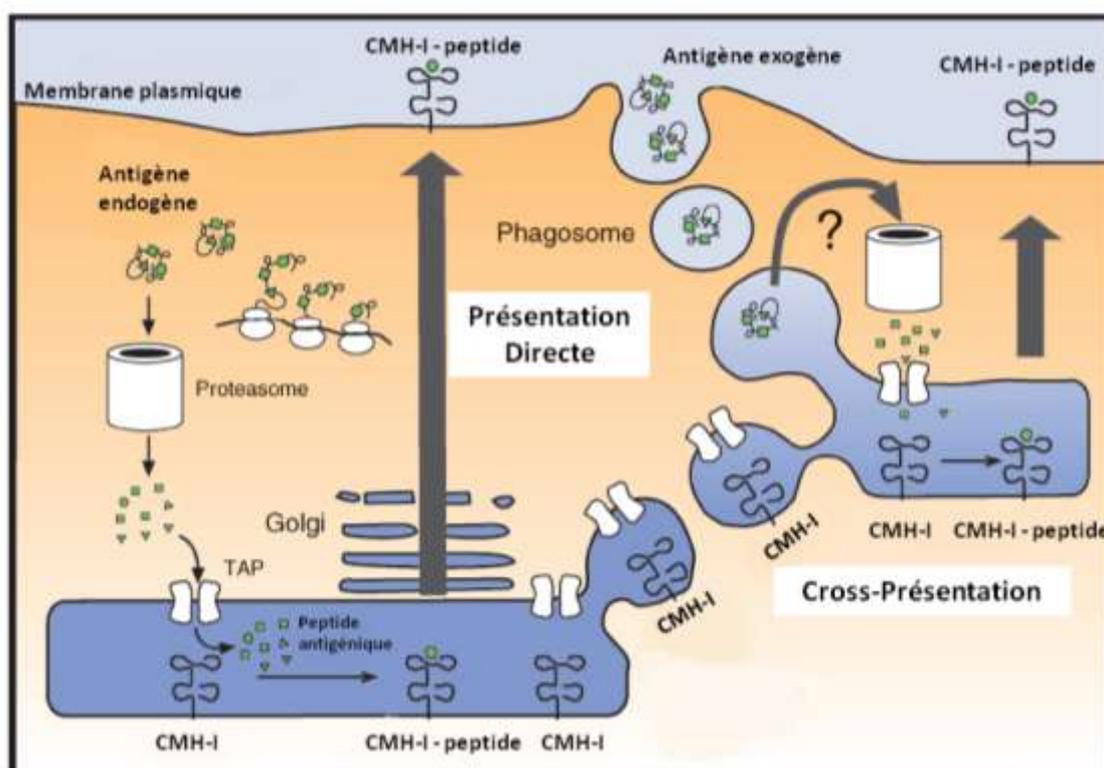


Figure 10. Les voies de présentation directe et de cross-présentation des antigènes par le CMH-I.

D'après Heath et al., Immunol. Reviews, 2004.(Heath et al., 2004)

Cette voie de cross-présentation semble être importante pour la génération de réponses restreintes au CMH-I contre des antigènes tumoraux ou des microbes, qui n'ont pas infectés les DCs. En effet, *via* ce processus, la DCs peut ingérer des corps apoptotiques de cellules tumorales ou infectées et dériver leurs peptides antigéniques pour engendrer une réponse T cytotoxiques anti-tumorale, anti-microbiale ou antivirale (Sigal et al., 1999; Schaible et al., 2003). Un tel mécanisme est également très important pour les processus de tolérance aux antigènes du soi (Luckashenak et al., 2008).

Comme l'indique la Figure 10, les mécanismes intracellulaires impliqués dans la cross-présentation ne sont pas encore assez bien définis. Deux modèles s'opposent : soit

les antigènes sont présentés **via la voie cytosolique (dépendante des TAPs et du protéasome)** (Figure 11-A et B-a-b), soit ils sont présentés **via la voie vacuolaire** (Figure 11-B-c) (Pfeifer et al., 1993), vraisemblablement indépendante de toute étape cytosolique, à l'image de la voie de présentation antigénique *via* les molécules de classe II et qui implique le trafic des molécules de CMH-I au phagosome. La voie vacuolaire est soutenue par une étude qui montre que l'ovalbumine associée à des billes ou des cellules ou encore le virus de l'influenza sont apprêtés dans les DCs par la cathepsine S présente dans les compartiments vacuolaires pour sa présentation par le CMH-I. En effet, les DCs déficiente pour la cathepsine S montrent une diminution du cross-priming des cellules T *in vivo*. D'autre part, l'inhibition du protéasome ne montre aucun effet sur la cross-présentation indépendante de TAP, suggérant que les mécanismes intracellulaires de la cross-présentation peuvent se passer dans les compartiments endocytaires (Shen et al., 2004). Ainsi, la cathepsine S pourrait jouer un rôle important dans la synthèse de peptides pour la voie de cross-présentation vacuolaire indépendante de TAP. Cependant, les preuves soutenant la sortie des antigènes dans le cytosol sont aujourd'hui assez nombreuses, notamment grâce à l'étude récente de Lin et al qui utilise les propriétés du cytochrome C hautement cytotoxique quand il est relargué dans le cytosol pour montrer la nécessité d'un passage au cytosol dans le mécanisme de cross-présentation. Il montre que le cytochrome C à haute concentration est toxique pour les DCs CD8+ (spécialiste de la cross-présentation) et pas pour les DCs CD8-, suggérant que le cytochrome C atteint le cytosol et déclenche l'apoptose seulement dans les DCs CD8+ (Lin et al., 2008). D'autres études montrent que l'export des antigènes dans le cytosol des DCs est plus efficace que chez les macrophages et plus rapide pour les petites molécules (Rodriguez et al., 1999).

L'autre objet de débat concernant la voie cytosolique est le recrutement au phagosome des composants du RE. Ainsi, la voie cytosolique est décomposée en deux autres modèles : **le modèle phagosome-cytosol-phagosome** (Figure 11-B-a) et **le modèle phagosome-cytosol-RE** (Figure 11-A-b et B-b).

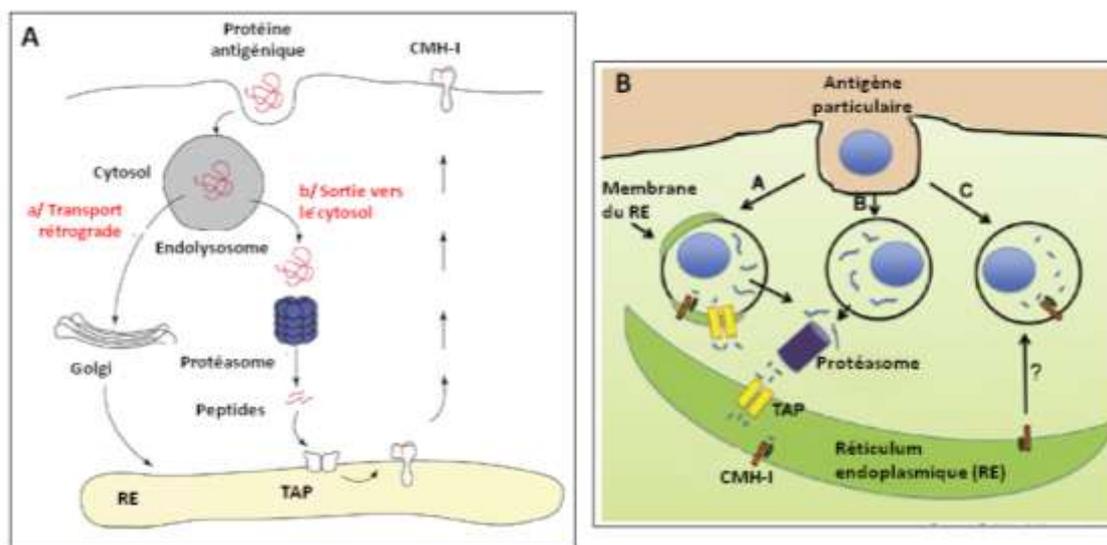


Figure 11. Les Voies d'apprêtement antigénique potentielles de la cross-présentation.
A- Les voies possibles de distributions au RE des antigènes solubles après internalisation dans les compartiments endo-lysosomiaux. *a/ Le modèle Endosome-RE* : Les antigènes suivraient la voie rétrograde des endosomes vers l'appareil de Golgi puis vers le RE. Du RE, les antigènes pourraient retourner dans le cytosol pour la dégradation via le protéasome. *b/ Le modèle Endosome-cytosol-RE* : les antigènes sortent directement des endosomes au cytosol pour être ensuite dégradés par le protéasome et suivre la voie de chargement peptidique classique des molécules du CMH-I via le RE (identique au B-b). D'après Monu et Trombetta, Curr. Op. Immunol., 2007.

B- Les voies possibles d'apprêtement antigénique sur le CMH-I après phagocytose d'antigènes particulaires. *a/ Le modèle phagosome-cytosol-phagosome* : le RE fusionnerait avec le phagosome et importerait les molécules de transport permettant la sortie des antigènes au cytosol pour leur dégradation en peptide via le protéasome. Ces peptides retourneraient ensuite dans le phagosome pour le chargement sur le CMH-I. *b/ Le modèle phagosome-cytosol-RE* : les antigènes sortent dans le cytosol pour être dégradés par le protéasome, puis les peptides entrent dans le RE via le transporteur TAP pour être chargés sur le CMH-I. *c/ Le modèle vacuolaire* : les peptides sont générés par protéolyse vacuolaire et chargés sur le CMH-I dans le phagosome. D'après Ramachandra et al, Curr. Op. Immunol., 2009.

En effet, des incertitudes demeurent quant à savoir si le RE fusionne avec le phagosome pour permettre l'apport de la machinerie nécessaire au chargement peptidique sur les molécules du CMH-I et permettre au phagosome de se comporter comme un compartiment autonome ou si les peptides sont transportés vers le RE via le transporteur TAP, afin de rejoindre la voie classique des molécules du CMH-I, ainsi les complexes CMH-I-peptide sont acheminés du RE à la membrane cytoplasmique. En 2002, le groupe de Michel Desjardins propose la possibilité d'une fusion du RE avec la membrane plasmique et le phagosome en formation (Gagnon et al., 2002). Bien que la contribution des membranes du RE à la formation des phagosomes fut contredite par le groupe de Grinstein (Touret et al., 2005), la présence de protéines résidentes du RE, telles que la tapasine ou l'ERp57 dans le phagosome est reportée par plusieurs groupes via des techniques de purification des phagosomes ou de microscopie électronique fournissant des preuves morphologiques (Guernonprez et al., 2003; Houde et al., 2003). Ainsi, de solides éléments montrent que le

phagosome pourrait acquérir des composants du RE. De plus, le groupe de Kurts a montré le transporteur TAP est recruté au niveau des endosomes après stimulation des DCs par le LPS, suggérant que les ligands de TLR pourraient contrôler une hypothétique interaction endosome-RE (Burgdorf et al., 2008). Le fait que le phagosome puisse agir comme un organe autonome dans la cross-présentation est également renforcé par la présence dans les endosomes d'une N-terminal peptidase IRAP (en anglais, insulin-regulated aminopeptidase) similaire à ERAP (Saveanu et al., 2009). La localisation endocytaire d'IRAP et l'incapacité pour les DCs déficientes en IRAP de cross-présenter supporte mais ne prouve pas un rôle actif des compartiments endocytaires plutôt que du RE dans l'apprêtement antigénique des peptides pour la cross-présentation, d'autant plus que les DCs déficientes pour ERAP montrent également une déficience de la cross-présentation. Ainsi, les données expérimentales à ce jour ne permettent pas d'exclure ou d'imposer une des deux voies cytosoliques (chargement peptidique dans le RE contre chargement peptidique dans les endosomes).

Une autre question se pose dans ce modèle : comment les peptides peuvent-ils accéder au cytosol ?

L'observation que les phagosomes contiennent des composants du RE suggèrent la participation de la voie de dégradation associée au RE (ERAD, ER-associated Degradation) dans l'export des peptides du phagosome au cytosol. Cette voie intervient dans la rétro-translocation des protéines non conformes du RE au cytosol pour leur dégradation par le protéasome. Le groupe de Cresswell a ainsi montré que l'inhibition du translocon Sec61, un composant d'ERAD par l'exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa* perturbait la cross-présentation de l'ovalbumine soluble (Guermonprez et al., 2003; Houde et al., 2003). Bien que ces résultats impliquent la participation d'ERAD dans la cross-présentation, les mécanismes précis sont encore peu compris. De plus, de récentes études montrent que d'autres protéines comme Derlin-1 pourraient être impliquées dans le rétro-transport des protéines du RE au cytosol (Lilley et Ploegh, 2004; Ye et al., 2004). L'implication de ces protéines dans la cross-présentation reste à explorer. Pour finir, un autre mécanisme pourrait expliquer le passage au cytosol des peptides du phagosome. Ce mécanisme implique les corps gras, qui sont des structures cytosoliques composées d'une monocouche lipidique, impliquées dans le métabolisme de lipides et qui se formeraient à partir du feuillet externe du RE (Fujimoto et al., 2008; Ploegh, 2007). Une récente étude montre que l'IGTP, une GTPase du RE, contrôle la cross-présentation puisque les DCs déficientes pour cette protéine présentent une incapacité à cross-présenter les antigènes, alors que la présentation sur le CMH-II reste fonctionnelle (Bougnères et al., 2009). Or, IGTP est principalement localisée dans les corps gras et le nombre de ces corps gras par cellules est diminué dans les DCs déficientes pour IGTP, suggérant un lien entre les corps gras et la

cross-présentation. En diminuant le nombre de corps gras dans les DCs par traitement pharmacologique ou interférence dans la biogénèse de ceux-ci (grâce à des souris déficientes pour ADFP), le groupe de S. Amigorena montre que la cross-présentation est inhibée (Bougnères et al., 2009). Bien que le mécanisme, par lequel ces corps gras interfèrent avec la cross-présentation soit encore inconnu, il est probable, que ces corps gras soit en se formant à partir des phagosomes contenant du RE, soit en fusionnant avec les phagosomes, favorisent la création d'une région membranaire instable permettant la fuite des peptides du phagosome vers le RE, similairement à ce qui a été proposé par le groupe de Ploegh pour la dislocation du RE (Ploegh, 2007).

5. Mécanismes de régulation des voies de présentation classe II et de cross-présentation

Compte tenu du fait que la plupart des antigènes peuvent être présentés aux lymphocytes T CD8+ et CD4+, une question se pose : les compartiments impliqués dans les deux voies de présentation sont-ils les mêmes ?

Récemment, une étude menée par le groupe de Kurts suggère l'existence de 2 compartiments endocytaires pour la présentation antigénique : un dédié à la présentation antigénique par les molécules des CMH-II et l'autre dédié à la cross-présentation. Leurs résultats proposent que seuls les antigènes, liant les récepteurs au mannose MR à la surface cellulaire sont ciblés vers les compartiments compétents pour la présentation par le CMH-I. Ce compartiment serait stoppé au stade 'endosome précoce', évitant ainsi une fusion avec les lysosomes afin de préserver un environnement favorable à la cross-présentation. L'endocytose médiée par les autres récepteurs guiderait leurs antigènes vers les compartiments compétents pour la présentation par le CMH-II, qui eux fusionneraient avec les lysosomes (Burgdorf et al., 2007; Burgdorf et Kurts, 2008). Cependant, la possibilité que le mécanisme visualisé par ces travaux soit en fait l'organisation fonctionnelle connue des voies endocytaires, entre endosome précoce considéré comme compartiment de recyclage et endosome tardif comme compartiment lysosomal n'est pas à écarter. En effet, certains récepteurs sont connus pour être recyclés rapidement et continuellement entre les endosomes précoces et la membrane cellulaire, d'autres gagnent les profondeurs des voies endocytaires jusqu'aux compartiments lysosomaux, où leur recyclage serait plus rare. De plus, une récente étude du groupe de Villadangos montre que le défaut d'expression des récepteurs MR n'affecte la cross-présentation que dans les DCs dérivées des monocytes (conditions inflammatoires) et pas dans les DCs CD8+ spléniques (état d'équilibre). Cette étude montre également que les DCs CD8+ spléniques n'expriment pas les récepteurs MR, ainsi ce mode de sélection de la présentation antigénique ne pourrait être applicable in vivo

qu'aux DCs migrantes qui sont les seules à capturer les antigènes mannosylés *via* les récepteurs MR pour la cross-présentation. D'autre part, la déficience en cross-présentation observée dans cette étude est plutôt due à une importante diminution de l'internalisation antigénique, plutôt qu'à un défaut dans la distribution des antigènes à des compartiments spécifiques (Segura et al., 2009).

Un autre mécanisme de régulation est proposé pour expliquer la régulation des différentes voies de présentation antigénique : la régulation du pH phagosomal par la NADPHoxydase, évoquée précédemment. En effet, la DC est dotée d'un système d'alcalinisation qui permet la neutralisation et le maintien de son pH phagosomal pendant plusieurs heures (Jancic et al., 2007). Dans les DCs déficientes pour NOX2, une des sous-unités du complexe protéique de la NADPHoxydase, le pH phagosomal et endosomal est plus acide et la protéolyse est augmentée conduisant à une cross-présentation plus faible. Ces résultats indiquent qu'une faible protéolyse accompagnée d'un pH peu acide est favorable à la cross-présentation (Savina et al., 2006). En effet, une trop forte protéolyse et un faible pH pourrait aboutir à la dégradation de certains épitopes du CMH-I ou être défavorable au chargement peptidique sur les molécules du CMH-I. La même régulation du pH et de la cross-présentation est observée dans les DCs humaines. En effet, des DCs dérivées de monocytes, issus de patients atteints de granulomatose septique chronique et présentant une mutation dans le complexe NOX2, sont incapables de maintenir un pH alcalin dans les phagosomes et présentent une perte du mécanisme de cross-présentation (Mantegazza et al., 2008).

En accord avec le fait que la cross-présentation requiert un pH neutre et une faible dégradation et avec l'idée que les récepteurs MR maintiennent les antigènes dans les compartiments endosomaux précoces, le groupe d'Unanue a récemment montré l'importance des compartiments endosomaux précoces dans la cross-présentation d'un antigène HEL (en anglais, Hen egg-white lysosozyme). HEL est cross-présenté *via* la voie vacuolaire c'est-à-dire de manière indépendante au transporteur TAP et résistante à la bréfeldine A, qui bloque le chargement peptidique au niveau du RE. Cette étude montre que lorsque HEL est délivré au niveau des endosomes tardifs *via* un mécanisme utilisant des liposomes, il est présenté sur les molécules du CMH-II et pas sur le CMH-I. Inversement, la distribution de HEL au niveau des endosomes précoces entraîne une présentation sur le CMH-I et le CMH-II. De façon intéressante, l'utilisation de chloroquine, un agent réduisant l'acidification du système endocytaire, inhibe la présentation antigénique d'HEL sur les molécules du CMH-II, même s'il est délivré au niveau des endosomes tardifs, alors que la présentation sur le CMH-I se voit augmentée (Belizaire et Unanue, 2009).

Ainsi, dans les deux modèles d'apprêtement antigénique, indépendant ou dépendant au TAP, le compartiment endosomal précoce semble jouer un rôle important dans la cross-présentation, notamment *via* la régulation son pH, comme le résume la Figure 12.

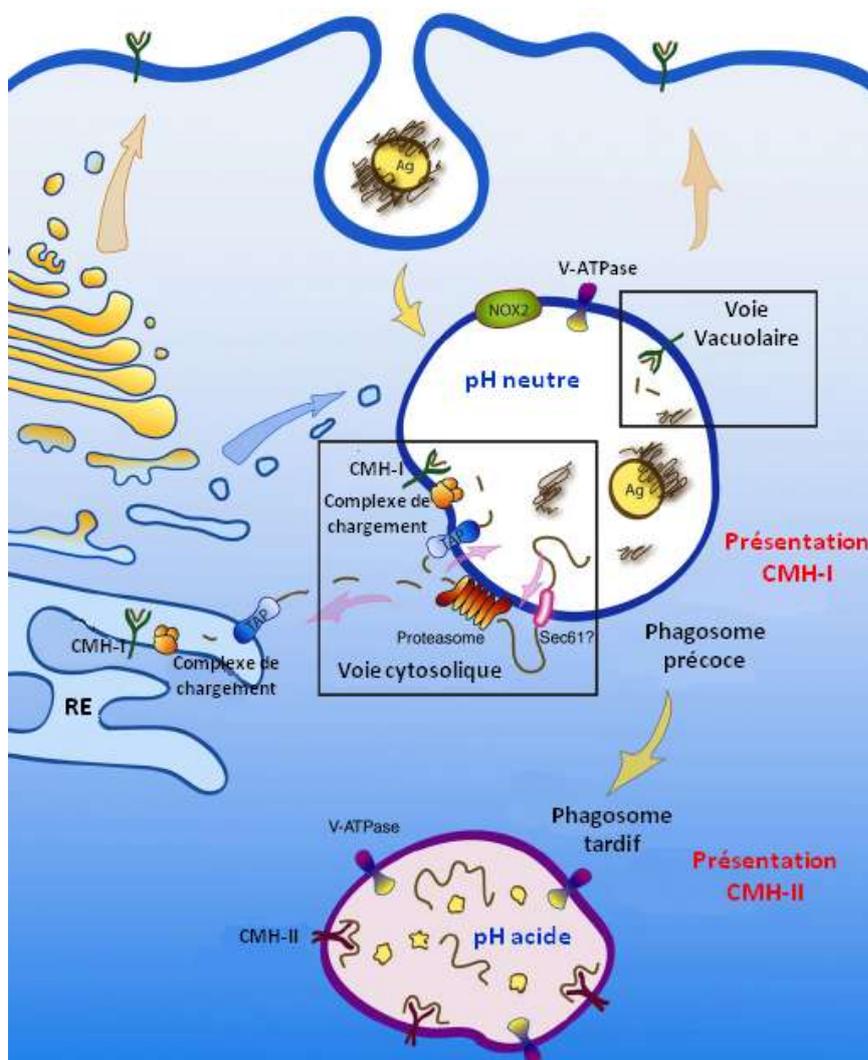


Figure 12. Les mécanismes de régulation de la cross-présentation et de la voie du CMH-II. Les compartiments précoces sont enrichis en certains composants du RE et montrent un pH élevé et un faible environnement de dégradation (comparé aux compartiments tardifs) du fait de la production continu d'espèces réactives oxygénées par la NADPH oxydase. C'est probablement ce compartiment qui permet la cross-présentation des antigènes sur les molécules du CMH-I, soit *via* la voie cytosolique, soit *via* la voie vacuolaire. Les phagosomes et endosomes vont ensuite mûrir et perdent les composants du RE : le pH et la protéolyse augmente. Ce compartiment devient incompetent pour la cross-présentation, mais acquiert un environnement nécessaire au chargement peptidique sur les molécules du CMH-II (pH acide pour le chargement peptidique et l'activité de H2-M et forte protéolyse pour couper les longs peptides qui s'associent aux molécules du CMH-II) D'après Amigorena et Savina, Curr. Op. Immunol., 2010.

D. L'activation et la polarisation des lymphocytes T

1. L'activation initiale

Après la capture et l'apprêtement antigéniques, les DCs sont prêtes pour activer les lymphocytes T naïfs spécifiques de l'antigène présenté. Un contact stable et durable s'établit entre les deux partenaires : c'est la synapse immunologique. Dans cette synapse, les cellules vont interagir par l'intermédiaire de nombreuses molécules pour aboutir à l'activation des lymphocytes T et à la polarisation de la réponse immunitaire.

Dans un premier temps, la synapse se forme grâce à l'interaction de molécules d'adhérence présentes sur les 2 types cellulaires. Par exemple, DC-SIGN exprimé par la DC va interagir avec ICAM-3 (CD54) sur les lymphocytes T avec une grande affinité, même en absence d'antigène (Geijtenbeek et al., 2000). D'autres molécules d'adhésion sont impliquées dans les interactions DC-T, comme les intégrines LFA-1 (CD11a/CD18) interagissant avec ICAM-1 (CD54) mais aussi ICAM-2 (CD102) (Martz, 1987) et ICAM-3 ou comme la glycoprotéine CD2 qui interagit avec LFA-3 (CD58) (Wang et al., 1999). Ces interactions vont permettre au récepteur des cellules T (TCR) de balayer la surface cellulaire des DCs pour rencontrer des complexes CMH-peptides d'intérêt (Geijtenbeek et al., 2000).

L'engagement du TCR avec un complexe CMH-peptide constitue le 1^{er} signal d'activation, qui renforce l'augmentation de l'affinité des molécules d'adhésion et stabilise la synapse. Ce signal 1 n'est pas suffisant au déclenchement de la cascade de signalisation intracellulaire nécessaire à l'activation de la cellule T. Les DCs fournissent donc un 2^{ème} signal, *via* les molécules de co-stimulation. Il existe deux familles de molécules de co-stimulation : la superfamille des B7-CD28 et celle des récepteurs au TNF (figure 13). **La superfamille des B7-CD28 peut être différenciée en 3 voies** : B7-1 (CD80)/B7-2 (CD86) qui interagit avec le CD28 ou le CTLA-4 des lymphocytes, ICOS-ICOSL et PD1-PDL1 ou PDL2. Les couples CD40/CD40L, OX40/OX40L, 4-1BB/4-1BBL, CD27/CD70, CD30/CD30L et HVEM/LIGHT font partis de **la famille des récepteurs au TNF**. Le signal majeur de co-stimulation est représenté par le B7-1 et B7-2 qui ont une double spécificité. Ils activent le récepteur stimulateur CD28 et le récepteur inhibiteur CTLA-4. L'engagement du CD28 constitue donc un 2^{ème} signal, qui en synergie avec le TCR, induit la sécrétion d'IL-2 par les lymphocytes. L'IL-2 sécrétée agit de manière autocrine et paracrine sur les lymphocytes T, induit leur prolifération et favorise la réponse mémoire. Cette sécrétion constitue le 3^{ème} signal nécessaire à l'amplification des lymphocytes T. D'autres cytokines peuvent constituer ce 3^{ème} signal, comme les cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les DCs, telles que l'IL-12 ou l'IFN α/β de type I, qui représentent les signaux prédominants pour l'induction des réponses T CD8+ à divers stimuli *in vivo*. Ces cytokines semblent agir sur le remodelage de

la chromatine des cellules T CD8+. Récemment, il est apparu que, comme les réponses CD8+, les réponses CD4+ ont besoin d'un 3^{ème} signal, qui semble être délivré par l'IL-1 (Curtsinger et Mescher, 2010). D'autre part, la liaison du CD28 permet d'augmenter la survie des lymphocytes T par la surexpression de Bcl-xL (Boise et al., 1995). Les lymphocytes T expriment constitutivement le CD28 alors que le CTLA-4 est induit après l'activation des lymphocytes T *via* le CD28 et présente une plus forte affinité pour les molécules B7 (Linsley et Ledbetter, 1993). CTLA-4, contrairement au CD28, envoie un signal négatif aux lymphocytes qui permet d'inhiber les signaux transduits par le CD28 et le TCR et ainsi de moduler la réponse immunitaire et de favoriser le retour à l'homéostasie. Comme le CTLA-4, toutes les autres molécules de co-stimulation (à l'exception du CD27 et de HVEM) sont induites après l'activation des lymphocytes T par la voie B7-1/CD28. De plus, le couple PD1/PDL1-PDL2 permet d'inhiber la prolifération des lymphocytes T et la production de cytokines (Sharpe et Freeman, 2002), à l'image du CTLA-4. Les autres couples permettent d'initier et de maintenir la prolifération des lymphocytes T ainsi que la sécrétion d'IL-2 en différentes étapes successives (Sharpe et Freeman, 2002). L'activation des lymphocytes T par la voie CD28 va induire l'expression du CD40L, qui va interagir avec le CD40 exprimé par les DCs. L'engagement du CD40 amplifie l'activation des DCs en augmentant la survie, l'expression des molécules du CMH, le CD80, le CD86 et la sécrétion de cytokines telles que l'IL-12, l'IL-1 et le TNF α , permettant ainsi l'amplification de leurs fonctions activatrices (Caux et al., 1994; Cella et al., 1996).

Les molécules impliquées dans la synapse immunologique se regroupent en un complexe central supramoléculaire d'activation (cSMAC) comprenant le TCR, les molécules CD4 et CD8, les molécules de co-stimulation et les molécules d'adhérence. Un réarrangement de l'actine qui se fixe au niveau du TCR *via* un complexe multimoléculaire permet la polarisation vers la CPA et la formation de la synapse (Dustin et Cooper, 2000). La force du signal envoyé par le TCR va influencer la nature des molécules régulatrices (CD28-CTLA4) qui s'accumulent dans la synapse (Egen et Allison, 2002).

2. La polarisation des lymphocytes CD4+

Les cellules T CD4+ jouent un rôle primordial dans l'orchestration de la réponse immune à travers sa capacité à fournir de l'aide aux autres cellules du système immunitaire. Selon le type et la maturation des DCs, l'environnement cytokinique et la reconnaissance CMH-peptide/TCR, les précurseurs CD4+ (Th0) peuvent se différencier en 4 voies principales : Th1, Th2, Th17 et iTregs (incluant les Tr1, Th3, iTregs CD4+CD25+FoxP3+). Les iTregs seront traités dans le chapitre tolérance.

Il est proposé 3 modèles pour expliquer comment les DCs sont capables d'induire ces différents types de réponses CD4⁺ : le modèle linéaire de maturation selon lequel différentes sous-populations de DCs seraient spécialisées pour induire différents types de réponses, le modèle temporel de maturation, selon lequel une DC immature va donner naissance à une DC mature qui va pouvoir induire une réponse Th1, puis qui pourra donner ensuite une réponse Th2 et enfin le modèle flexible de maturation, où une DC mature donnera soit une réponse Th1 soit une réponse Th2 (Reis e Sousa, 2006). Cela dit, la différenciation des cellules T naïves en cellules effectrices ne semblent pas un processus terminal. En effet, certaines études montrent qu'*in vitro* des cellules différenciées peuvent être reprogrammées en une autre population effectrice en fonction de l'environnement cytokinique (Th17 en Th1 ou des Tregs en Th17) (Nurieva et al., 2009; Zhou et al., 2009) (Figure 13)

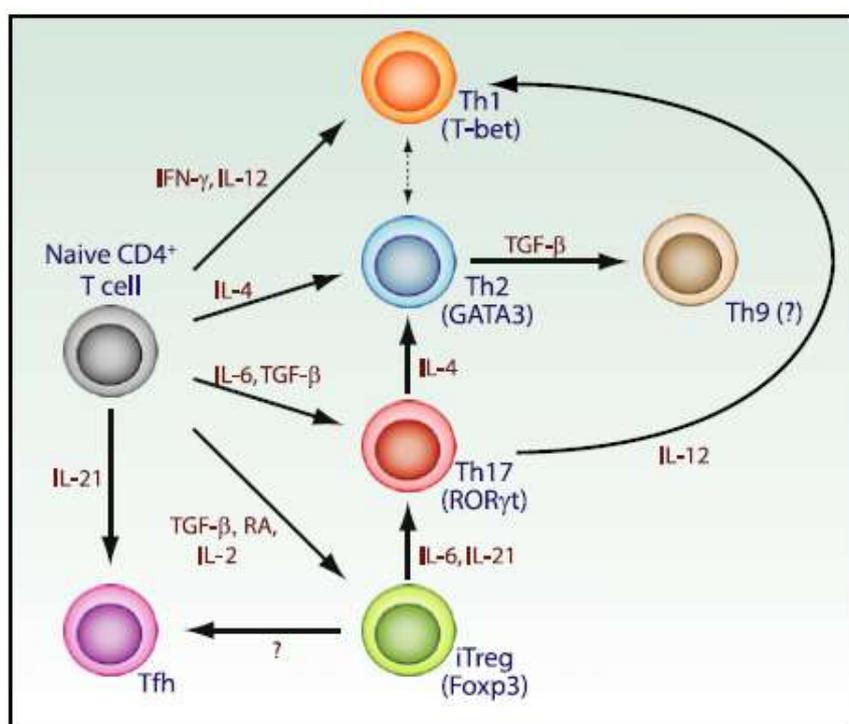


Figure 13. Hétérogénéité et plasticité des réponses CD4⁺.

D'après Zhou et al., Immunity, 2009.

→ Les Th1

Les Th1 sont caractérisées par leur sécrétion d'IFN γ et sont impliquées dans l'immunité cellulaire contre les organismes intracellulaire. L'IL-12 produite par les DCs et les cellules de l'immunité innée aussi bien que l'IFN γ produite par les cellules NK polarisent la différenciation des cellules T en cellules Th1 à travers l'action de STAT4 (en anglais, *signal transducer et activator of transduction*), STAT1 et le facteur de transcription T-bet (Zhou et al., 2009) (Figure 13).

→ Les Th2

La différenciation en type Th2 est induite par 2 cytokines principalement : l'IL-2 et l'IL-4 et l'induction de STAT6, qui vont conduire à l'action de GATA-3 (Zhou et al., 2009) (Figure 13). Ces cellules vont alors produire de nombreuses cytokines, telles que l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13. Elles contrôlent l'immunité humorale contre les helminthes et les pathogènes extracellulaires en agissant sur le « Switch » isotypique des Ig produites par les lymphocytes B, notamment *via* l'interaction CD40-CD40L (Lumsden et al., 2003).

Les deux sous-populations Th1 et Th2 sont capables de s'autoréguler. En effet, l'IFN γ produit par les cellules Th1 inhibe la prolifération et la sécrétion de cytokines par les cellules Th2. Inversement, les cytokines produites par les cellules Th2 inhibent la prolifération des cellules Th1.

→ Les Th17

Les Th17 sont induites par le TGF β en combinaison avec les cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-21 et IL-23. Ces cytokines inflammatoires déclenchent la phosphorylation de STAT3 et l'expression du facteur de transcription ROR γ T (en anglais, *retinoid-related orphan receptor γ T*). Les cellules Th17 produisent alors l'IL-17A, l'IL-17F, l'IL-22 et l'IL-21 et jouent un rôle dans l'élimination des bactéries extracellulaires et des champignons, spécialement au niveau des surfaces muqueuses (Zhou et al., 2009)(Figure 13). Des études supplémentaires ont impliqué un rôle des Th17 dans l'induction de l'auto-immunité, notamment dans la sclérose en plaque, l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis et les maladies inflammatoires de l'intestin.

Le rôle du TGF β dans la différenciation des Th17 est surprenant puisque cette cytokine est connue pour l'induction de cellules Tregs FoxP3+. Cela dit, l'ajout d'IL-6 inhibe la différenciation des cellules Tregs FoxP3+ dépendantes du TGF β (Bettelli et al., 2006). Ainsi, il a été proposé que l'IL-6, sécrétée pendant l'inflammation avait un rôle de pivot dans la détermination du devenir de la réponse immunitaire en jouant sur la balance entre la différenciation Th17 ou iTregs.

D'autre part, la différenciation en Th17 est inhibée par l'IFN γ et l'IL-4 (produites respectivement par les Th1 et Th2) (Stockinger et al., 2007), suggérant encore une autorégulation entre les différents types de cellules Th.

→ **Les Tfh (T follicular helper)**

Ce sont des cellules T CD4+ qui favorisent la différenciation des les cellules B en plasmocytes dans les organes lymphoïdes . La différenciation en ce type cellulaire requière l'IL-21 et pourrait dépendre du facteur de transcription Bcl-6 (Zhou et al., 2009) (Figure 13).

→ **Expression des récepteurs aux chimiokines par les T CD4+.**

La différenciation des cellules T CD4+ est accompagnée par l'expression de récepteurs aux chimiokines distincts et l'acquisition de capacités migratoires différentes par les cellules CD4+. Ainsi les cellules Th1 expriment 'préférentiellement' le CCR5, le CXCR3 et le CXCR6, alors que les cellules Th2 expriment 'préférentiellement' le CCR4 et le CCR8, ainsi que le CRTh2, un récepteur pour la prostaglandine D₂ couplé à la protéine G (Syrbe et al., 1999). Bien que les Th1 et Th2 polarisées *in vitro* expriment des récepteurs aux chimiokines différents, les cellules T CD4+ générées *in vivo* expriment un profil plus complexe de récepteurs à chimiokines pouvant mélanger les profils Th1 et Th2. Par exemple, une fraction de cellules T fraîchement isolée du sang périphérique exprime le CCR4, récepteur à chimiokines de type Th2 et le CXCR3, récepteur à chimiokines de type Th1 et produit de l'IFN γ après stimulation (Andrew et al., 2001). Cela dit, les réponses des cellules T CD4+ polarisées pourraient être amplifiées par une boucle de rétrocontrôle positive impliquant les chimiokines. Par exemple, le facteur de transcription T-bet dirige la différenciation en Th1 mais aussi l'expression du CXCR3 (Lord et al., 2005). L'IFN γ active le facteur de transcription STAT1 dans les cellules résidentes des tissus, qui vont à leur tour augmenter leur sécrétion du ligand de CXCR3, qui va accroître le recrutement de plus cellules Th1 exprimant CXCR3 et sécrétant l'IFN γ (Mikhak et al., 2006; Sundrud et al., 2003) (Figure 14). Similairement, le facteur de transcription GATA-3 dirige la différenciation en Th2 et aussi l'expression du récepteur à chimiokine de type Th2, CCR4 (Sundrud et al., 2003). L'IL-4 active le facteur de transcription STAT6 dans les cellules résidentes des tissus, qui induit la production du ligand pour le CCR4 par celles-ci et le recrutement de cellules Th2 sécrétant l'IL-4 et exprimant le CCR4 (Mathew et al., 2001)(Figure 14). Ces résultats suggèrent qu'en dépit du fait que l'expression des récepteurs à chimiokines puisse se recouper entre les Th1 et les Th2, les chimiokines et/ou leurs récepteurs peuvent être des cibles utiles pour bloquer le trafic des cellules T vers les tissus dans les réponses inflammatoires polarisées. De façon analogue aux réponses des cellules Th1 et Th2, les réponses des cellules Th17 pourraient aussi être amplifiées par une boucle de rétrocontrôle positive impliquant les chimiokines (voir Figure 14). D'autre part, les Tregs expriment un large panel de récepteurs à chimiokines. En effet, les Tregs FoxP3+ spécifique d'antigène augmentent leur expression des récepteurs d'adressage aux tissus non lymphoïdes qui

recourent ceux des Th1 (CCR5, CXCR3, CXCR6), ceux des Th2 (CCR4 et CCR8) et ceux des Th17 (CCR6, CCR4, CXCR3 et CCR2) (Lee et al., 2007a). Ce recouplement dans les profils d'expression des récepteurs chimiociniques entre les Tregs et les différents T effecteurs pourraient permettre aux Tregs de se co-localiser avec les divers effecteurs T, pour induire la suppression d'un large panel de conditions inflammatoires. Cette observation donne lieu à un modèle de régulation lié à l'expression des récepteurs à chimiokines et la migration des Tregs décrit dans la Figure 14. Suivant les conditions cytokiniques présentes durant leur activation, des Tregs avec des profils d'expression de récepteurs à chimiokines vont être générées et ces profils vont permettre de dicter la façon dont les Tregs vont contrôler l'activité des différentes sous-populations de T effecteurs.

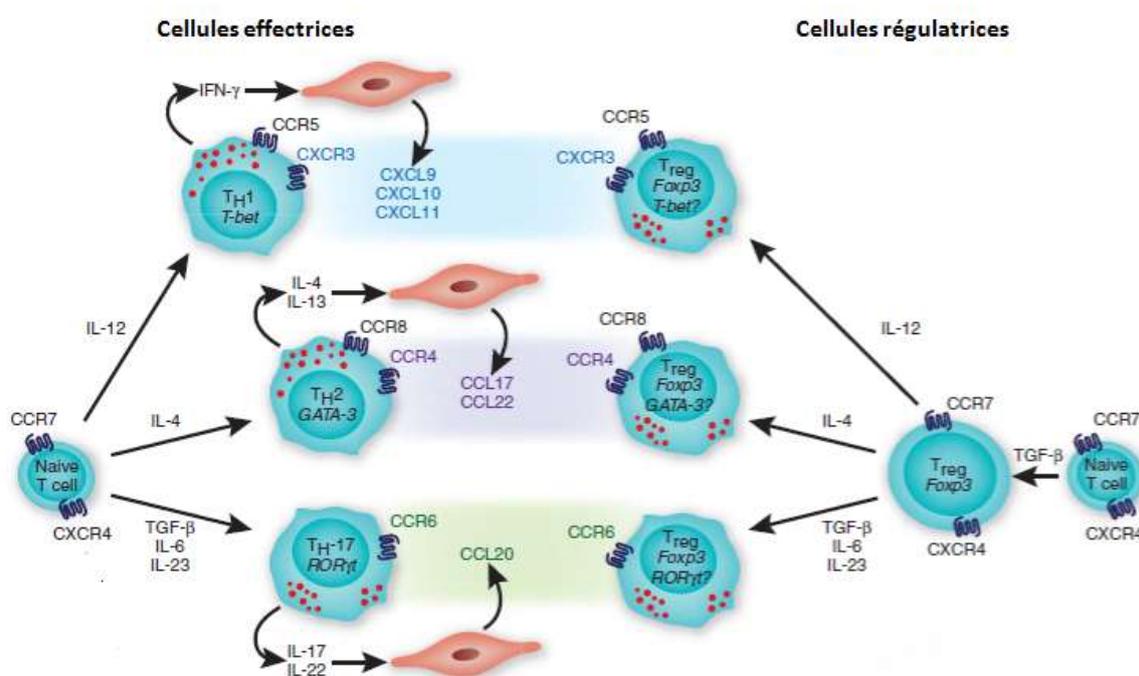


Figure 14. Modèle de régulation de la réponse immunitaire via l'expression des récepteurs à chimiokines.

D'après Bromley et al, Nature Immunol., 2008.

A gauche, l'amplification médiée par les chimiokines des cellules T effectrices CD4⁺ Th1, Th2 et Th17 dans les tissus inflammés. A droite, les Tregs activés dans les mêmes conditions et exprimant les mêmes récepteurs à chimiokines que les cellules effectrices, ce qui pourrait permettre leur co-localisation dans les tissus inflammés et la suppression de l'inflammation médiée par les cellules T effectrices.

3. Différenciation et mécanismes effecteurs des cellules T CD8⁺

La reconnaissance des antigènes présentés sur les molécules du CMH-I et l'IL-2 produite par les cellules CD4⁺ activées permettent la différenciation et l'activation des CD8⁺ en cellules T cytotoxiques (CTL).

Les CTL peuvent tuer leurs cellules cibles par 2 voies distinctes :

- la sécrétion des granules cytotoxiques contenant la perforine et les granzymes. La perforine provoque la formation de pores dans la membrane cible permettant aux granzymes d'entrer dans la cellule et d'induire la lyse par apoptose des cellules cibles.

-la liaison de Fas porté par les cellules cibles avec son ligand FasL porté par les CTL induit également la mort des cellules cibles par apoptose.

Les cellules T CD8+ ont également des profils d'expression des récepteurs à chimiokines différents. Les cellules T CD8+ naïves expriment les récepteurs d'adressage aux organes lymphoïdes CCR7 et CD62L. Après leur activation, les CTL vont exprimer les récepteurs à chémokines CCR5, CXCR3 et CXCR1 permettant leur migration dans les tissus inflammés (Bromley et al., 2008).

E. La tolérance

La tolérance immunologique est définie par une réponse incomplète du système immunitaire vis-à-vis d'un antigène. La tolérance envers les antigènes du soi implique des mécanismes de la sélection négative dans le thymus (tolérance centrale) et des mécanismes en périphérie (tolérance périphérique) (Figure 15).

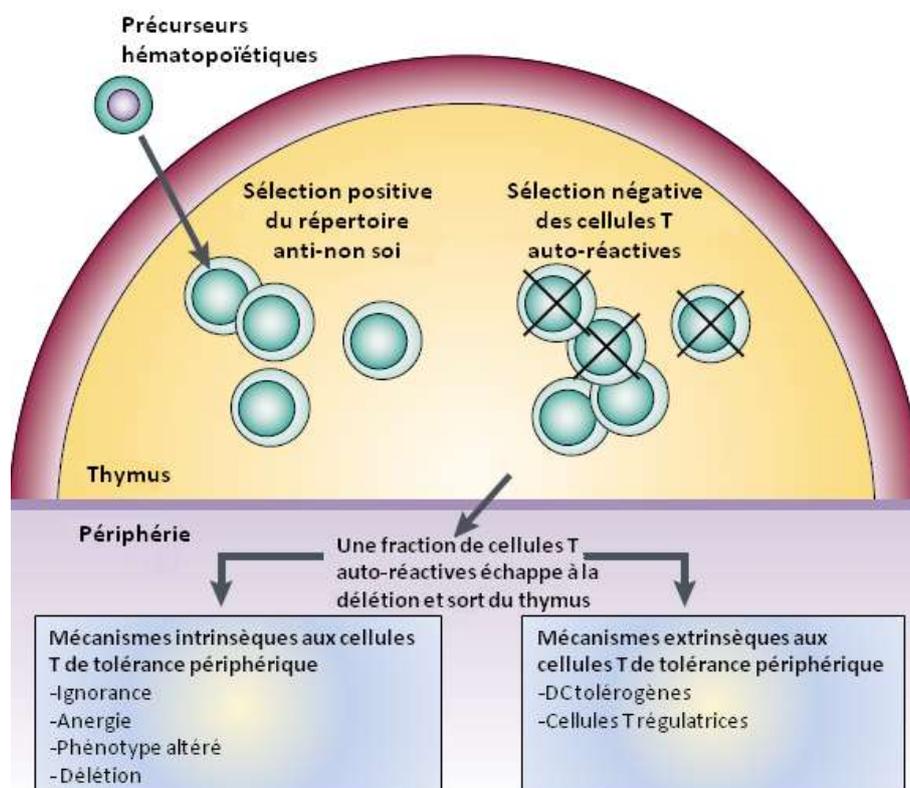


Figure 15. Les voies de la tolérance.
D'après Walker et Abbas, Nature Immunol., 2002

1. La tolérance centrale

Les lymphocytes T se développent dans le thymus à partir de précurseurs provenant de la moelle osseuse. Le réarrangement des gènes de leur TCR se produit lors de leur développement et le répertoire lymphocytaire est défini grâce à la sélection positive puis négative (Figure 15).

La **sélection positive** permet de conserver les thymocytes capables de reconnaître *via* leur TCR un peptide sur une molécule du CMH du soi. En effet, les cellules épithéliales du cortex thymique présentent aux cellules T des complexes CMH-peptides et fournissent un signal de survie aux cellules capables d'interagir avec les molécules du CMH du soi. Les cellules T qui ne reconnaissent pas assez fortement les molécules du CMH du soi meurent par apoptose dans le cortex (Benoist et Mathis, 1989).

La **sélection négative** intervient ensuite et permet d'éliminer les cellules dont le TCR se fixe trop fortement aux antigènes du soi. Cela joue un rôle primordial dans la tolérance au soi, en éliminant une grande partie des cellules autoréactives. Cette sélection peut être effectuée par les cellules épithéliales thymiques médullaires mais ce sont les DCs présentes dans le thymus qui apparaissent comme les principaux acteurs de cette sélection (Anderson et al., 1998) . Un large répertoire de peptides du soi peut être présenté dans le thymus, notamment des antigènes exclusivement exprimés dans certains tissus comme l'insuline, un antigène spécifique des îlots pancréatiques (Kyewski et al., 2002). Cette expression de peptides du soi est sous le contrôle d'un gène régulateur de la transcription AIRE (en anglais, AutoImmune REgulator). Ainsi, AIRE entraîne l'expression de nombreuses protéines du soi, qui peuvent être rencontrées en périphérie et permet d'établir un état de tolérance au soi par délétion clonale des thymocytes autoréactifs. Par ailleurs, la délétion du gène AIRE entraîne le développement de maladies auto-immunes (Zuklys et al., 2000; Gavanescu et al., 2007).

Les thymocytes réactifs au soi ne sont cependant pas tous éliminés après la sélection négative dans le thymus (Figure 15). Les mécanismes périphériques du maintien de la tolérance sont donc également essentiels et peuvent constituer des approches pour comprendre les différents mécanismes de tolérance induits par certaines molécules ou être utilisés pour induire une tolérance aux alloantigènes en contexte de transplantation.

2. La tolérance périphérique

→ Les mécanismes intrinsèques de tolérance périphérique.

Quatre mécanismes de tolérance périphérique intrinsèques aux cellules T sont décrits : la délétion, l'anergie, l'ignorance immunologique et l'altération du phénotype.

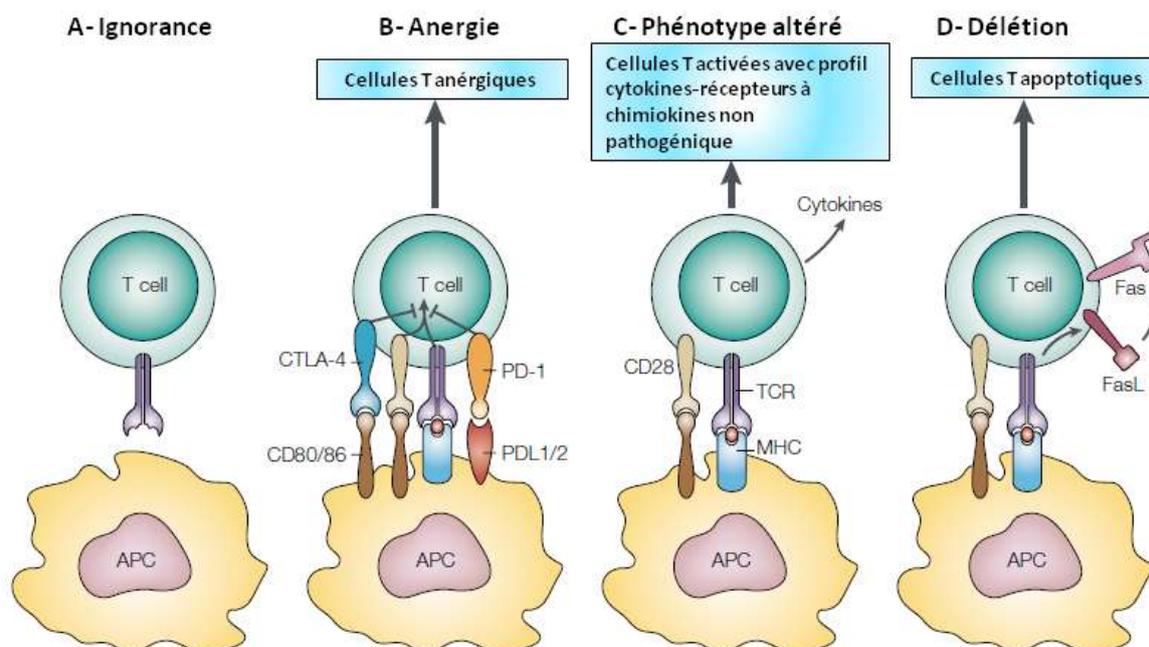


Figure 16. Les mécanismes intrinsèques de la tolérance périphérique.

D'après Walker et Abbas, *Nature Immunol.*, 2002.

La délétion permet d'aboutir à l'apoptose des cellules T qui sont activées de façon trop importante *via* le mécanisme de mort cellulaire induite par l'activation (AICD, en anglais, activation induced cell death). Ce mécanisme peut être dépendant des récepteurs de mort cellulaire comme le système Fas/FasL (Brunner et al., 1995) (Figure 16-D) ou le récepteur du TNF, mais aussi indépendant de ces récepteurs via le granzyme B ou la kinase sérine-thréonine HPK-1 (Brenner et al., 2008). Un autre concept de mort cellulaire est aussi décrit : c'est la mort cellulaire autonome des cellules activées (ACAD, en anglais, activated cell autonomous death), qui intervient en absence de signaux de survie appropriés. Dans ce phénomène, le membre pro-apoptotique de la famille BCL-2, Bim apparaît comme essentiel et induit des voies apoptotiques dépendantes des mitochondries (Krammer et al., 2007). Cela dit, ce mécanisme semble plus fortement impliqué dans la délétion des thymocytes lors de la sélection négative dans le cadre de la tolérance centrale. D'autre part, il a récemment été montré que Bim avait un rôle important dans l'activation des cellules T auto-réactives dans le cadre du diabète autoimmun et pourrait donc un double rôle dans le contrôle de

l'activation ou de l'apoptose des cellules T auto-réactives (Ludwinski et al., 2009; Gronski et Weinem, 2006).

L'anergie est un état d'inactivation fonctionnelle de la cellule T, qui devient réfractaire à toute restimulation par l'antigène. L'anergie a été montrée *in vitro* comme le résultat de l'engagement du TCR en absence de co-stimulation (Walker et Abbas, 2002). L'anergie est caractérisée par une incapacité des cellules T à proliférer et à produire de l'IL-2 et peut-être levée par une addition d'IL-2 (Essery et al., 1988). Cependant, l'anergie requière la ligation du CTLA-4 *in vivo* et nécessite donc que les molécules de co-stimulation CD86 et CD80 ne soient pas bloquées (Figure 16-B). L'utilisation de molécule de fusion CTLA4-Ig ou d'anticorps anti-CD28 permet d'observer une prolongation de la survie des allogreffes et d'induire une tolérance en empêchant le contact B7-CD28 (Guillonneau et al., 2007; Haspot et al., 2005). Cela dit, l'utilisation des anti-CD28 semble plus approprié pour induire une tolérance massive, étant donné que les molécules CTLA-4 restent libres : le signal activateur est bloqué, alors que le signal inhibiteur reste fonctionnel.

L'ignorance (Figure 16-A) correspond à une situation, où des cellules T potentiellement réactives ne répondent pas à une stimulation antigénique, soit parce que ces dernières sont séquestrées dans des sites peu accessibles au système immunitaire lymphoïde, soit parce que la quantité d'antigènes n'atteint pas le seuil requis pour déclencher une réponse T (Walker et Abbas, 2002).

Même si les cellules T deviennent complètement activées, une tolérance efficace peut toujours être maintenue si la nature de la réponse est telle que les effets pathogéniques sont évités. C'est ce qu'il peut se passer quand le trafic des lymphocytes est altéré par un défaut d'expression de récepteur à chimiokine, ce qui peut empêcher le lymphocyte de rencontrer son partenaire cellulaire et induire une auto-immunité (Figure 16-C). Par exemple, en réponse à un antigène tolérogène, les cellules T prolifèrent mais leur migration vers les zones contenant les cellules B est défectueuse (Kearney et al., 1994). Cette migration est dépendante de CXCR5, qui est complètement induit avec l'ajout d'adjuvant (Ansel et al., 1999). Une expression aberrante de ce récepteur à chimiokine conduit au développement de l'auto-immunité dans le lupus murin (Ishikawa et al., 2001)

→ **Les mécanismes extrinsèques aux cellules T effectrices de la tolérance périphérique**

La tolérance périphérique peut être également induite par des processus actifs dans lesquels une population de cellules contrôle ou régule l'activité d'une autre population

comme la suppression des réponses immunitaires par les cellules T régulatrices ou l'inhibition de ces mêmes réponses par les DCs tolérogènes.

Il existe plusieurs sous-populations de cellules Tregs : les Tregs naturelles (nTreg) et les Tregs induites (iTreg).

Les **Tregs CD4+CD25+ naturelles** sont produites dans le thymus lors de la sélection thymique. Chez le rat et la souris, le seul marqueur spécifique des Tregs est le facteur de transcription FoxP3. Chez l'homme, l'identification des Tregs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ nécessite un autre marqueur le CD127, récepteur à l'IL-7 puisque les lymphocytes T humains peuvent exprimer le FoxP3 après activation. Les Tregs naturelles humaines sont donc CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD127^{lo}, les cellules activées étant CD127^{hi}. Ils existent naturellement en périphérie où elles représentent 5 à 15% des cellules CD4⁺ dans les tissus lymphoïdes. Leur rôle principal est le contrôle de l'activation et/ou de l'expansion des cellules T autoréactives ayant échappé à la sélection thymique et aux autres phénomènes de tolérance périphérique. Elles empêchent le développement de réponses auto-immunes dans les organes lymphoïdes et ont la capacité de migrer dans les sites de l'inflammation. Elles peuvent produire du TGFβ et leur capacité suppressive est en partie dépendante de cette cytokine. Une fois activées, elles sont capables d'inhiber la prolifération et la production de cytokines des cellules T effectrices.

Contrairement aux nTregs, les iTregs sont induits après stimulation en périphérie. Classiquement, 3 populations sont décrites les iTregs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, les Tr1 et les Th3.

Les **iTregs CD4+CD25+FoxP3+** ont le même phénotype et les mêmes propriétés que les iTregs mais sont générées en périphérie (Shevach, 2006). Le TGFβ permet l'induction *in vivo* et *in vitro* d'iTregs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ à partir de cellules T CD4⁺CD25⁻, en présence d'IL-2 (Fantini et al., 2004).

Les **cellules Tr1** sont produites à partir de cellules T CD4⁺ activées en présence d'IL-10 et produisent de fortes quantités d'IL-10 mais aussi d'IL-5, de TGFβ et d'IFNγ. L'IL-10 est donc une cytokine cruciale pour la fonction et la génération des Tr1, l'ajout d'un anticorps anti-IL-10 bloquant leur activité suppressive (Groux et al., 1997).

Les **cellules Th3** ont été découvertes chez les souris protégées de l'EAE (encéphalite allergique expérimentale) par administration orale de la protéine basique de la myéline (MBP) et sont caractérisées par leur forte production de TGFβ, leur faible expression d'IL-10 et d'IL-4 et leur absence de sécrétion d'IFNγ et d'IL-2 (Chen et al., 1994; Fukaura et al., 1996). La différenciation *in vitro* des cellules Th3 est favorisée par l'IL-4, l'IL-10 et le TGFβ et

inhibée par l'IL-12. Les Th3 sont capables de réguler de manière non spécifique à l'antigène les cellules Th1 et Th2 *via* la production de TGF β et d'induire la différenciation des lymphocytes T naïfs en cellules Tregs CD4+CD25+FoxP3+ (Weiner, 2001; Carrier et al., 2007).

Plusieurs mécanismes par lesquels les cellules régulatrices inhibent l'activation et la prolifération des cellules T effectrices sont à l'heure actuelle décrits. La suppression des cellules régulatrices se fait *in vivo* **via l'intermédiaire de cytokines**, telles que le TGF β , l'IL-10 ou l'IL-35. Ce rôle des cytokines TGF β et IL-10 a surtout été démontré dans la suppression par les cellules Th3 et Tr1 (Groux et al., 1997; Weiner, 2001). Les Tregs naturelles exercent leurs fonctions suppressives *in vitro* plutôt **par des contacts cellulaires** que par la sécrétion de cytokines (Thornton et Shevach, 1998). Ces contacts cellulaires entre les nTregs et les cellules T effectrices s'effectuent notamment *via* le CTLA4, qui est exprimé constitutivement par les Tregs. Les cellules Tregs pourraient également **induire la lyse des cellules cibles** *via* la voie Fas/FasL ou la voie granzyme/perforine (Vignali et al., 2008). Enfin, les cellules Tregs peuvent aussi **interagir avec les DCs pour moduler leur maturation**. Encore une fois, l'interaction CTLA4-B7 est impliquée dans cette modulation des DC. En effet, les cellules régulatrices peuvent lier les molécules B7 des DCs *via* le CTLA4, ce qui provoque une expression par les DCs de l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO), une molécule intervenant dans le métabolisme du tryptophane et produisant de ce fait des molécules pro-apoptiques induisant la suppression des cellules T effectrices (Vignali et al., 2008). Les Tregs peuvent également inhiber la capacité des DCs à activer les cellules T effectrices en influant sur leur expression de molécules de co-stimulation, même si les mécanismes précis ne sont pas connus. Récemment, il a été suggéré que la molécule LAG3 (exprimé par les Tregs) pouvait interagir avec les molécules du CMH-II des DCs et bloquer leur maturation (Liang et al., 2008). Ces DCs capables d'induire et de maintenir des phénomènes de tolérance sont regroupées sous le terme **DCs tolérogènes** et sont décrites dans le chapitre suivant.

3. Les DCs tolérogènes

→ **La terminologie et les mécanismes d'action des DCs tolérogènes**

Le caractère tolérogène des DCs n'est pas spécifique à une sous-population de DCs en particulier, ni comme je l'ai précédemment évoqué, à leur état de maturation. En effet, le concept bimodal par lequel les DCs immatures favoriseraient la tolérance des cellules T en opposition avec les DCs matures immunogènes est, depuis plusieurs années, remis en question (Tisch, 2010; Rutella et al., 2006). La maturation des DCs varie suivant la nature de l'activation et la façon dont les signaux, issus des PPRs, sont intégrés par la cellule. Ainsi, la variation dans la délivrance des signaux 1,2 et 3 est la base nécessaire à l'induction d'un effet tolérogène par les DCs. Les DCs tolérogènes peuvent avoir un phénotype mature ou immature. Les DCs immatures montrent une capacité d'activation des cellules T réduite et leur phénotype immature peut être activement maintenu après l'engagement de certains récepteurs, en absence d'inflammation. Ainsi, la phagocytose de corps apoptotiques, qui représentent une importante source d'antigènes du soi, permet la conversion des DCs immatures en DCs tolérogènes (Kushwah et al., 2010). De plus, certains récepteurs de type lectine C, qui fonctionnent comme des PPRs pour les pathogènes, peuvent également lier et endocyter des antigènes du soi glycosylés. Il a été proposé qu'en l'absence de l'activation d'autres PPRs, l'engagement des récepteurs de type lectine C peut, dans ce contexte, conduire à la génération de DCs tolérogènes (Figure 17-1). En effet, l'apport d'antigènes couplés à l'anticorps anti-CD205 induit la délétion des cellules T et les souris traitées avec ce complexe anti-CD205/antigène sont incapables de répondre à une restimulation (Bonifaz et al., 2002). En plus de l'induction de la délétion clonale des cellules T, les DCs immatures exercent leurs propriétés tolérogènes, notamment en induisant l'anergie (Steinman et al., 2003). L'activation des DCs immatures par l'engagement d'un PPR induit la maturation des DCs, qui deviennent immunogènes et capables de fournir aux cellules T les signaux 1,2 et 3, ce dernier signal étant sous la forme de cytokines pro-inflammatoires (Figure 17-2). Cela dit, les DCs matures sont également importantes pour induire l'expansion clonale des cellules Tregs naturelles et maintenir une tolérance périphérique (Yamazaki et al., 2003) (Figure 17-4). D'autre part, les DCs matures, effecteur immunogène peuvent être converties en effecteur tolérogène, notamment en présence de Tregs. Suivant les signaux d'activation, les DCs matures peuvent également montrer des fonctions tolérogènes caractérisées, soit par le signal 1 et 2 en l'absence du signal 3, soit par le signal 1, 2 et 3, ce dernier étant sous la forme de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF β (Figure 17-3). En effet, les DCs matures peuvent induire la tolérisation de cellules T CD8+, si elles manquent d'un 3^{ème} signal, émanant par exemple d'une liaison dépendante du CD40 avec des cellules T

CD4⁺ effectrices (Albert et al., 2001). Ainsi, il a été proposé un état de maturation intermédiaire « semi-mature » pouvant être induit par différents stimuli, comme l'IL-10 ou le TNF α (Lutz et Schuler, 2002a; Menges et al., 2002).

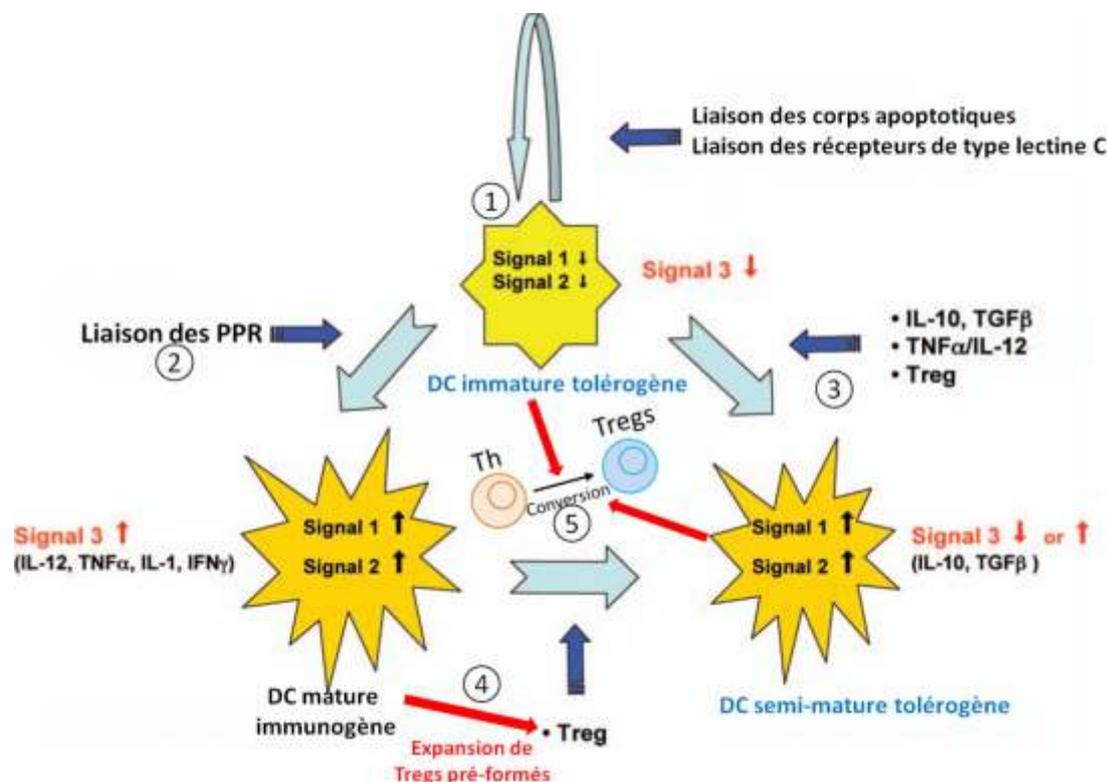


Figure 17. Les stades de maturation des DCs dans l'induction de la tolérance

Adapté de Tisch, International Rev. of Immunol, 2010 et Rutella et al., Blood, 2006.

Un des mécanismes d'induction de la tolérance par les DCs immatures ou semi-matures est la conversion des cellules T naïves en cellules Tregs (Figure 17-5). En effet, des DCs immatures CD11c^{lo}CD45RB⁺ dérivées de la moelle osseuse cultivées en présence d'IL-10 et de TNF α sont capables d'induire des cellules Tr1, chez la souris (Wakkach et al., 2003). Cette même capacité d'induction des cellules Tregs productrices d'IL-10 a été observée avec des DCs humaines matures (Verhasselt et al., 2004).

Toutes ces DCs tolérigènes, en condition d'équilibre, sont supposées jouer un rôle important dans l'induction de la tolérance périphérique par différents mécanismes, qui incluent, comme nous venons de le voir, l'induction de Tregs et la délétion clonale de cellules T autoréactives, mais aussi la production de facteurs suppressifs, comme l'IL-10, le TGF β ou l'IDO. Des études récentes montrent un lien entre la signalisation induite par le TGF β et l'IDO dans la régulation de la tolérigénicité spontanée des DCs chez la souris (Belladonna et al., 2008). D'autres molécules régulatrices apparaissent être cruciales dans l'induction de la tolérance, par les DCs au repos, des cellules T CD8⁺ périphériques, comme PD-1 et CTLA-

4, tandis que l'engagement de PSGL-1 sur les DCs induit l'expression des gènes codant pourIDO, TGF β et IL-10 et augmentent leur capacité à générer des Tregs CD4⁺ CD24⁺ FoxP3⁺ (Thomson, 2010). Enfin, des études récentes réalisées sur les DCs tolérogènes et les cellules T CD4⁺ humaines ont montré indiquent un rôle crucial de ICOS exprimé par les cellules T dans l'induction de la tolérance périphérique par anergie, mécanismes indépendant de l'IL-10 (Tuettenberg et al., 2009).

→ Les DCs intrathymiques, hépathiques et les pDCs tolérogènes

La tolérance centrale est dépendante des DCs intrathymiques. Les DCs thymiques, impliquées dans la génération de Tregs polyclonaux sont matures, efficaces pour la présentation antigénique sur les molécules du CMH-II et expriment de forts niveaux de chimiokines CCL-17 et CCL-22, qui favorisent l'interaction avec les thymocytes CD4⁺ exprimant le CCR-4 (Thomson, 2010). De telles DCs, pourraient induire à la fois la sélection négative des cellules T spécifiques d'antigènes périphériques et le développement de Tregs. De plus, les DCs traitées avec la lymphopoïétine stromale thymique (sécrétée par les cellules stromales thymiques) développent la capacité d'induire des Tregs et il a récemment été montré que des DCs dérivées de la moelle osseuse conditionnées avec cette lymphopoïétine peuvent protéger les souris NOD (non obese diabetic) du diabète de type1 (Besin et al., 2008).

Par ailleurs, le microenvironnement hépathique permet la différenciation de progéniteurs hémapoïétiques en DCs tolérogènes et les DCs du foie sont impliquées dans la tolérogénicité inhérente des allogreffes hépathiques. Ainsi, dans le microenvironnement du foie, l'exposition constante aux antigènes microbiens provenant de l'intestin pourrait induire des DCs hépathiques réfractaires à la stimulation des TLR4, un phénomène nommé la tolérance à l'endotoxine, comme démontré chez la souris (Thomson, 2010). De plus en comparaison à d'autres DCs des tissus lymphoïdes secondaires, les DCs hépathiques murines sont de faibles stimulatrices des réponses T effectrices allogéniques et peuvent induire une hyporéactivité des cellules T allogéniques. Chez l'homme, ces caractéristiques des DCs intrahépathiques ont été confirmées : elles produisent de faibles quantités d'IL-10 en réponses à la stimulation du TLR-4 et génèrent plus de cellules Tregs CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ et de cellules Th2 produisant de l'IL-4 via un mécanisme indépendant à l'IL-10 (Bamboet et al., 2009). Ainsi, du fait d'une réactivité des cellules immunes innées et une capacité à réguler les fonctions des cellules T, les DCs hépathiques pourraient favoriser la tolérogénicité hépathique.

Les pDCs ont également été décrites comme possédant la capacité d'induire des cellules Tregs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. En effet, dans un modèle de tolérance d'allogreffes cardiaques chez la souris, les pDCs du receveur sont capables de capturer et d'apprêter les alloantigènes du greffon et de migrer vers les ganglions lymphatiques par la suite. Dans les ganglions lymphatiques, ces pDCs présentent les alloantigènes aux cellules T et induisent des cellules Tregs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Ochando et al., 2006). Chez le rat, au laboratoire, il a été montré que les pDCs matures pouvaient expandre *in vitro* les cellules Tregs CD4⁺CD25⁺, un phénomène qui nécessite un contact cellulaire entre les pDCs et les cellules T mais qui est indépendant de l'IL-2 (Ouabed et al., 2008). Plus récemment, dans un modèle d'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE), il a été démontré que les pDCs, recrutées au niveau des ganglions lymphoïdes, établissaient des contacts spécifiques de l'antigène de la myéline et dépendante du CMH-II avec les cellules CD4⁺. Ces interactions permettent l'expansion sélective des cellules T CD4⁺ régulatrices naturelles et spécifiques de la myéline et inhibent les réponses T autoimmunes (Irla et al., 2010).

→ La génération *in vitro* des DCs tolérogènes

Tous ces mécanismes par lesquels les DCs induisent et maintiennent la tolérance au soi ont été exploités pour la **génération *in vitro* de DCs tolérogènes** pour induire la tolérance aux alloantigènes du donneur dans un contexte de transplantation (Moreau et al., 2009) ou aux autoantigènes du soi dans un contexte d'auto-immunité (Verginis et al., 2005). Les DCs tolérogènes, ainsi générées, sont immatures, résistantes à la maturation ou semi-activées et expriment les molécules du CMH, un taux faible de molécules de co-stimulation activatrices comparé aux inhibitrices et ont une capacité altérée de production de cytokines pro-inflammatoires de type Th1, telles que l'IL-12p70, tandis que la production de molécules anti-inflammatoires telles que l'IL-10 ou l'indoléamine 2,3 dioxygénase (IDO) est augmentée (Morelli et Thomson, 2007). Différents agents immunosuppresseurs ou anti-inflammatoires tels que l'IL-10, le TGFβ1, des inducteurs de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), comme la prostaglandine E2, l'histamine, les β2-agnistes ou les neuropeptides, le métabolite de la vitamine D3 1α,25-dihydroxyvitamine D3 (1α,25-(OH)2D3) et son analogue la glucosamine, l'antioxydant N-acétyl-L-cystéine ou le cobalt protoporphirine (CoPP) inducteur de l'hème-oxygénase-1 (HO-1), ainsi que le transfert de gène d'HO-1 et le monoxyde de carbone (Annexe 1 : (Remy et al., 2009)) ont permis la manipulation *in vitro* des DCs pour générer des DCs tolérogènes. Ces agents ciblent la différenciation des DCs mais aussi leurs fonctions telles que la sécrétion de cytokines, l'expression des marqueurs de maturation, la capture et l'apprêtement antigénique et la migration des DCs vers les organes lymphoïdes secondaires (Hackstein et al., 2001; Morelli et Thomson, 2007). La Figure 18 propose un

résumé des différentes techniques de génération *in vitro* des DCs tolérogènes et des différents effets immunosuppresseurs observés sur la fonction des DC.

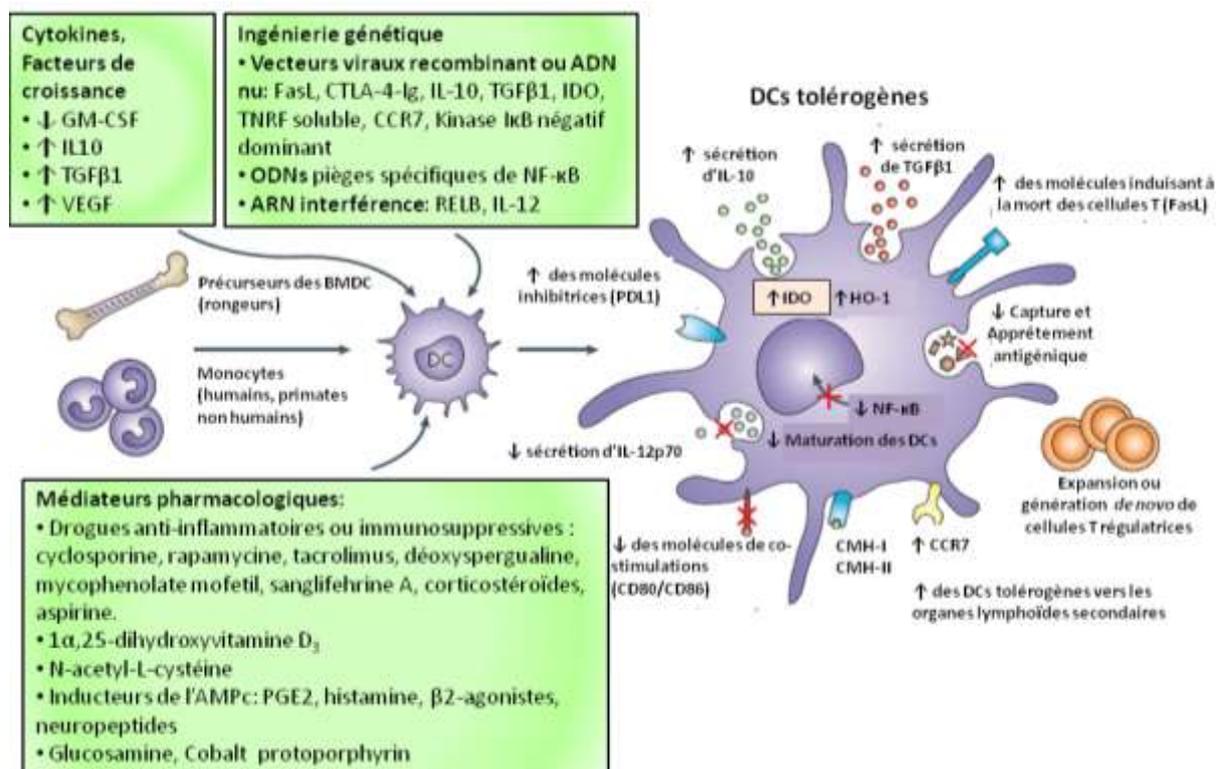


Figure 18. La génération de DCs tolérogènes *in vitro*.

D'après Morelli et Thomson, Nature Immunol., 2007

Les DCs, qui sont générées *in vitro* à partir des précurseurs de la moelle osseuse (en anglais, Bone marrow derived DC, BMDC) chez le rongeur ou des monocytes sanguins chez l'homme ou le primate non humain, sont rendues tolérogènes par le contrôle de leurs conditions de culture, telles que l'exposition aux cytokines, aux facteurs de croissance, à des médiateurs pharmacologiques ou par ingénierie génétique. Les DCs, générées dans de telles conditions, peuvent réguler l'issue des réponses des cellules T *via* une unique fonction prédominante ou, plus fréquemment, la combinaison de plusieurs fonctions. CCR7, CC-chimiokine receptor 7; CTLA4-Ig, cytotoxic T-lymphocyte antigen 4-immunoglobulin fusion protein; GM-CSF, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor; HO1, hème oxygénase-1; IDO, indoléamine 2,3-dioxygénase; IκB, inhibitor of NF-κB; NF-κB, nuclear factor-κB; ODN, oligodeoxynucleotide; PGE2, prostaglandine E2; TGFβ1, transforming growth factor-β1; TNFR, tumour-necrosis factor receptor; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Ces DCs tolérogènes pourraient être utilisées pour l'immunothérapie basée sur la tolérance spécifique de l'antigène, notamment dans le diabète de type 1 (T1D, en anglais, *Type 1 diabetes*).

4. Le diabète de type 1 : la rupture de la tolérance

→ Les mécanismes cellulaires et moléculaires du T1D

Le T1D est une maladie auto-immune qui découle de la destruction sélective des cellules β pancréatiques sécrétant l'insuline par les cellules T CD8+ et T CD4+

autoréactives. Ainsi, un grand intérêt est porté aux thérapies d'immuno-intervention sur les cellules T pour prévenir ou traiter la maladie. Plusieurs auto-antigènes ont été identifiés dans le T1D, principalement l'hormone insuline/pro-insuline, la décarboxylase acide-glutamique (GAD), l'antigène 2 de la phosphatase tyrosine des îlots pancréatiques (IA2) et la protéine apparentée à la sous-unité catalytique du glucose-6-phosphate spécifique des îlots (IGRP). Ces auto-antigènes représentent une cible pour les cellules T CD8+ autoréactives. Les cellules CD4+ pathogéniques expriment un phénotype Th1, produisant l'IFN γ . Dans les souris diabétiques non-obèses (NOD), qui développent un diabète auto-immun spontanément, la maladie est accélérée par injection d'IL-12, qui favorise la différenciation Th1. Par contre, le blocage du développement des réponses Th1, grâce à l'administration d'un anticorps neutralisant l'IFN γ ou d'un antagoniste de l'IL-12, inhibe efficacement la progression de la maladie. La Figure 19 résume les différents mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le développement ou la prévention du T1D. L'initiation du T1D prend place dans le pancréas, où les cDCs capturent et apprêtent les antigènes des cellules β , qui sont relargués à la suite de la destruction des cellules β par apoptose naturelle ou après infection virale. La réplication virale peut être contrôlée par les pDCs ou les cellules NKT invariantes (iNKT), empêchant ainsi l'inflammation consécutive à l'infection et le développement du T1D (non montré par la Figure 19). Les cDCs, ainsi activées, migrent dans les ganglions lymphatiques pancréatiques drainants et stimulent les cellules T spécifiques des antigènes des îlots pancréatiques. Les macrophages présents dans les ganglions peuvent favoriser l'activation des cellules T diabétogéniques en sécrétant de l'IL-12 (Lehuen et al., 2010). Les cellules B peuvent également participer à l'activation des cellules T diabétogènes en présentant les antigènes des îlots et sécrètent des auto-anticorps (non montré par la Figure 19). A ce niveau, l'activation des cellules T diabétogènes peut être inhibée par les cDCs, notamment à travers l'engagement du PDL-1. D'autre part, les iNKT peuvent favoriser le recrutement des DCs et pDCs tolérogènes, qui induisent l'expansion de Tregs par la production d'IDO, de l'IL-10, du TGF β et d'ICOS-L (Lehuen et al., 2010). Ainsi, le développement de la maladie est sous le contrôle de cellules T CD4+ régulatrices hétérogènes, incluant les nTregs centraux et les iTregs périphériques (Chatenoud et Bluestone, 2007). Les cellules T diabétogènes et régulatrices, une fois activées, migrent dans le pancréas. Les cellules T diabétogènes vont détruire les cellules β dans le pancréas. La destruction des cellules β peut aussi être induite par les cellules NK. Les mécanismes de destruction impliquent le relarguage d'IFN γ , du granzyme ou de la perforine. Les macrophages peuvent aussi participer à la mort des cellules β , via la production d'IL-1 β , de TNF et de NO. Les cDCs, par leur production d'IL-12, vont permettre le maintien des fonctions effectrices des cellules T diabétogènes et des cellules NK. D'autre part, la destruction des cellules β va induire la maturation et la capture des antigènes des îlots par

les DCs intra-pancréatiques. Ces DCs vont ensuite migrer vers les ganglions pancréatiques pour amplifier la réponse des cellules T CD8+ autoréactives (Melli et al., 2009). Cela dit, suivant le contexte, la destruction des cellules β peut être inhibée par les cellules Tregs, qui régulent la fonction effectrice des cellules T diabétogènes et des cellules de l'immunité innée par sécrétion d'IL-10 et de TGF β . Les pDCs tolérogènes, stimulées par les iNKT, peuvent elles aussi contrôler la mort des cellules β en produisant l'IDO. Enfin, les cellules β via l'expression du PDL-1 peuvent inhiber les cellules T diabétogènes. Ainsi, cette communication complexe entre l'immunité innée et adaptative induit le développement ou la prévention du T1D et le but des immunothérapies actuelles est de favoriser les réponses régulatrices dans le but de contrôler la progression du T1D chez les patients diabétiques.

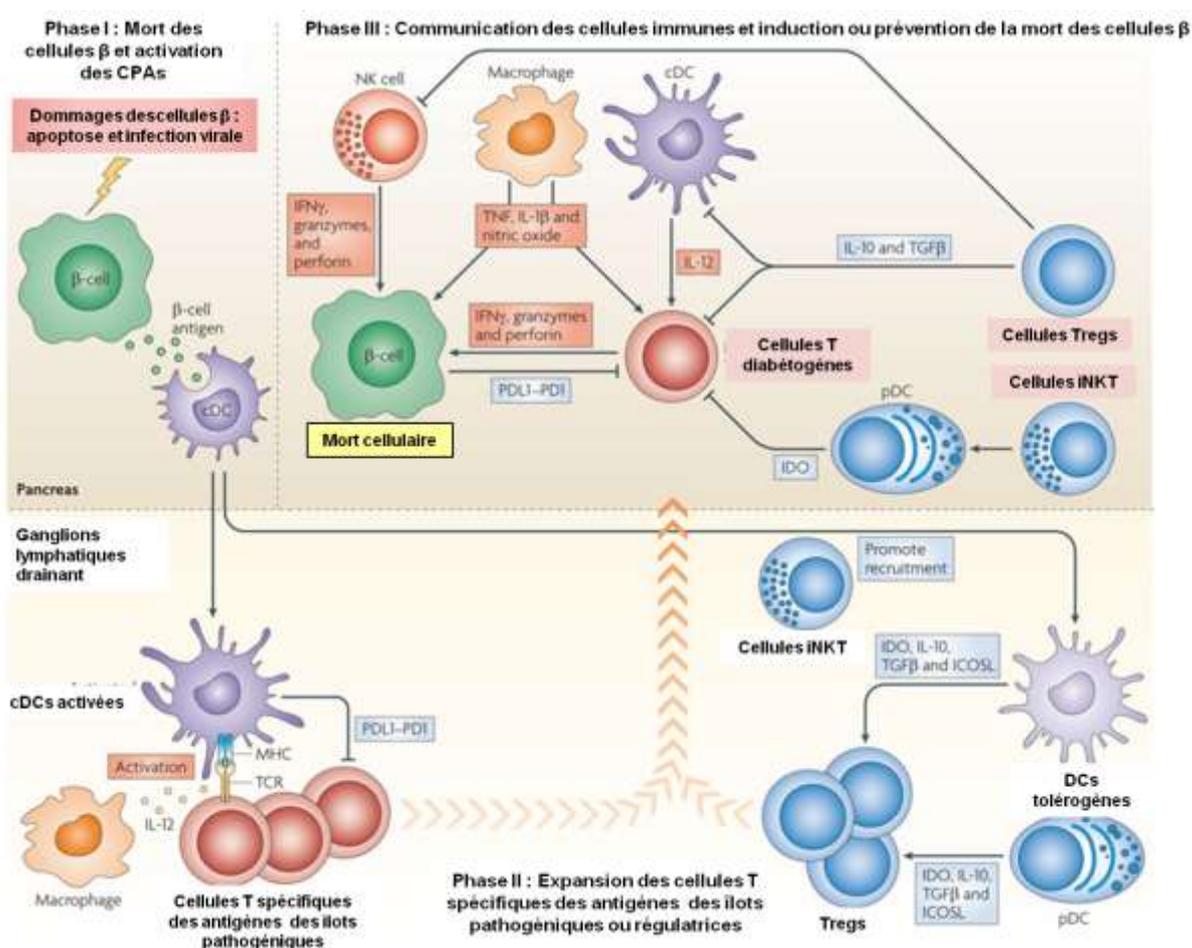


Figure 19. Les mécanismes cellulaires et moléculaires dans le développement ou la prévention du T1D.

D'après Lehuen et al, Nature Immunol. Rev., 2010.

→ Les stratégies d'immunothérapies dans le T1D

Dans le cadre du T1D, différentes stratégies d'immunothérapies sont envisagées : des thérapies médiées par des anticorps et des approches antigènes spécifiques.

Les anticorps thérapeutiques testés chez l'homme ou l'animal regroupent les anticorps monoclonaux anti-CD3 et les anticorps anti-CD20. **L'anticorps anti-CD3** permet de rétablir une homéostasie immunitaire, grâce à la modulation des complexes CD3-TCR par leur internalisation ou leur relargage et/ou grâce à l'apoptose ou l'anergie des cellules T auto-réactive activée (c'est l'effet à court terme), ce qui laisse par la suite la place pour une reconstitution homéostatique qui favorise la sélection, la survie et l'expansion de Tregs induites, qui permettent l'établissement d'une tolérance à long-terme (Chatenoud et Bluestone, 2007). Différents essais thérapeutiques ont été lancés chez l'homme. Dans le premier essai clinique de phase I et II, les patients atteints du T1D ont reçu pendant 2 semaines au moment du début du diabète clinique l'anticorps monoclonal anti-CD3, le teplizumab. Cet anticorps, administré sans autre traitement immunosuppresseur, a permis de ralentir la progression de la maladie pendant un minimum d'un an chez la plupart des patients, certains ont même montré des améliorations jusqu'à 3 ans. Des augmentations significatives d'IL-10 et d'IL-5 dans le sérum de deux tiers des patients ont été observées (Chatenoud et Bluestone, 2007). Un autre essai clinique de phase II européen incluant 80 patients, avec un autre anticorps anti-CD3 (ChAglyCD3) a aussi montré des bénéfices dans l'issue de la maladie, comme la préservation de la fonction des cellules β à 6, 12 et même 18 mois dans certains cas, ce qui conduit le patient à réduire ses besoins en insuline pendant au moins 18 mois, après une seule injection de l'anticorps (Chatenoud et Bluestone, 2007).

L'anticorps anti-CD20 cible, quant à lui, les cellules B, dont le rôle a été mis en évidence chez les souris NOD déficientes en cellules B dont les lésions inflammatoires sont réduites. D'autre part, il a été montré que la déplétion des cellules B CD20+ au début de l'hyperglycémie chez la souris NOD empêche le diabète et peut induire des cellules B produisant de l'IL-10 « régulatrices ». Un récent essai clinique avec un anti-CD20 (Rituximab) a donné des résultats modestes (23% des cas) mais permis des améliorations significatives de la fonction des cellules β , qui déclinent à partir de 3 mois après le traitement (Luo et al., 2010).

D'autres modèles de thérapies sont à l'étude chez l'animal, comme cibler les cytokines et les récepteurs de cytokines impliqués dans la pathogénèse du diabète de type 1 (Luo et al., 2010).

D'autres thérapies très prometteuses **basées sur la spécificité antigénique** sont à l'étude. Ces thérapies ont pour but de cibler les cellules T autoréactives pour les inactiver de manière antigène spécifique. Au départ, les auto-antigènes, comme l'insuline ou le GAD, ont été administrés par voie orale pour induire une tolérance chez le patient. Devant l'échec de ces essais, d'autres stratégies ont été élaborées, comme coupler l'insuline de manière covalente à des splénocytes *via* l'éthylène carbodiimide (ECDI) (Luo et al., 2010). Cette liaison covalente induit une rapide apoptose des cellules liées à l'antigène d'intérêt et

l'injection de ces cellules *in vivo* permet aux CPA endogènes de capturer ses antigènes et d'initier une réponse tolérogène à ces antigènes. Cette méthode est en cours d'essai clinique, notamment chez des patients diabétiques. L'importance de cette méthode réside dans le fait que plusieurs épitopes impliqués dans la pathogénèse du diabète peuvent être ciblés. En effet, chez la souris NOD, la progression de la maladie impliquerait une activation séquentielle des cellules T autoréactives par de multiples épitopes diabétogéniques : c'est l'« extension » épitopique (en anglais, epitope spreading) (Luo et al., 2010). Ces cellules s'accumulent jusqu'au diagnostic clinique, quand suffisamment de cellules effectrices sont présentes pour induire la destruction de la majorité des cellules β . L'épitope 9-23 de la chaîne B de l'insuline (InsB₉₋₂₃) (A, cellules effectrices rouges, Figure 20) apparaît être un épitope diabétogène pathogénique initiateur ou très précoce chez la souris NOD. En effet, l'injection de splénocytes couplés à cet épitope ou à l'insuline entière dans les 4 à 6 semaines de vie de la souris permet d'inhiber le développement du diabète clinique (1, Figure 20). Plus la destruction des cellules β progresse, plus de nouveaux épitopes apparaissent, comme InsB₁₅₋₂₃ et/ou IGRP (B, cellules effectrices bleues, Figure 20) et éventuellement d'autres épitopes de la chaîne A ou B (non InsB₉₋₂₃) (C, cellules effectrices vertes, Figure 20). Ces deux derniers épitopes apparaissent être dominant dans la transition vers une maladie bien établie (environ 75% des cellules β détruites), car seuls les splénocytes couplés à l'insuline entière (et non ceux couplés à l'épitope InsB₉₋₂₃, permettent une amélioration de la progression du diabète dans les souris âgées de 18 à 20 semaines (2, Figure 20). Enfin, la guérison du T1D quand toutes les cellules β sont détruites pourrait être envisagée grâce à la combinaison de deux thérapies : la tolérance aux épitopes initiateurs de la maladie et le remplacement par des techniques de transplantation d'îlots pancréatiques (nécessitant également des thérapies tolérogènes) ou la régénération des cellules β (3, Figure 20). Chez l'homme, un profil similaire d'étalement épitopique est également fortement envisagé.

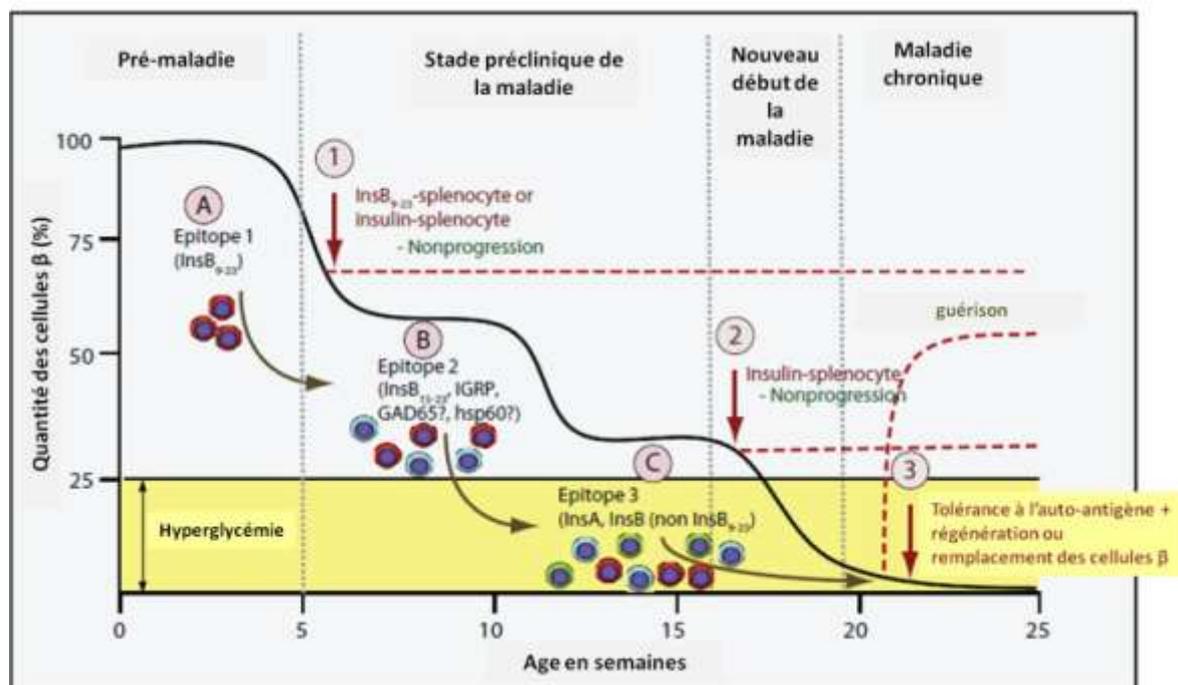


Figure 20. Modèle de la diversité des épitopes et de la thérapie toléro-gène dans la pathogénèse du T1D chez la souris NOD.

D'après Luo et al, Immunity, 2010

Ainsi, toutes les thérapies basées sur l'induction de la tolérance de façon antigène dépendante fournissent un fort espoir de guérison dans les maladies auto-immunes et les DCs apparaissent comme les cellules clés pour médier cette tolérance antigène-spécifique, soit par injection de DCs toléro-gènes chargées avec le peptide d'intérêt, soit par des méthodes indirectes *via* des cellules cargos portant l'antigène et phagocytées par les CPA endogènes du patient pour l'induction de la tolérance.

Au laboratoire, une molécule a été particulièrement étudiée : HO-1, notamment pour ces propriétés immunorégulatrices dans le cadre d'allogreffes cardiaques et aortiques chez le rongeur (Bouche et al., 2002; Braudeau et al., 2004; Chauveau et al., 2002). Cette molécule permet de rendre les DCs humaines et de rat réfractaires à la maturation induite par le LPS en inhibant l'expression des molécules de co-stimulation, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et la production de réactifs oxygénés (Chauveau et al., 2005). Ces DCs traitées HO-1 possèdent donc des caractéristiques toléro-gènes, ce qui rend donc HO-1 intéressante pour l'immunothérapie, notamment dans ces contexte d'auto-immunité. Mon travail de thèse ayant eu pour but de continuer la caractérisation du rôle d'HO-1 et de ses produits de dégradation sur la biologie des DCs, la seconde partie de mon introduction sera donc consacrée à la description des propriétés immunosuppressives de cette enzyme.

Partie II : Les propriétés immunorégulatrices de l'hème-oxygénase-1 et du monoxyde de carbone

L'hème oxygénase-1 (HO-1) est une des 3 isoformes (HO-1, 2 et 3) de l'enzyme hème oxygénase, qui catabolise **la dégradation de l'hème en biliverdine avec la production de fer libre et de monoxyde de carbone (CO)**. La dégradation de l'hème par l'hème oxygénase représente **la source principale du CO dans le corps** (plus de 85% de la production de CO)(Ryter et al., 2006). La biliverdine est ensuite convertie en bilirubine *via* l'action de la biliverdine réductase. Contrairement aux deux autres isoformes constitutivement exprimées, **HO-1 est inducible** par différents stimuli, comme les agents du stress oxydatif, les cytokines pro-inflammatoires mais aussi quelques agents anti-inflammatoires. Les effets anti-inflammatoires, anti-apoptotiques et anti-prolifératifs liés à ses produits de dégradation ou à la déplétion en hème font d'HO-1 **une molécule centrale dans les maladies inflammatoires**.

I- Les effets immunosuppresseifs d'HO-1 sur le système immunitaire

Le Tableau 4, à la fin de ce chapitre, propose un récapitulatif des effets médiés par HO-1 ou ses produits de dégradation dans différentes pathologies, telles que l'auto-immunité, l'allergie, les infections bactériennes et virales, ainsi que dans le cadre de la transplantation. Tous ces effets sont décrits plus en détail dans ce chapitre.

A. HO-1 : une molécule immunosuppressive naturelle

Des avancés dans la compréhension des mécanismes liées d'HO-1 ont été faites, il y plus d'une dizaine d'années, par la génération de souris transgéniques déficientes pour HO-1 (Poss Kd et Tonegawa S, 1997a; Yet et al., 1999). Malgré une faible viabilité de la progéniture, l'étude des animaux survivants a montré qu'ils développaient **des anémies liées à l'accumulation du fer dans le foie et le rein**, suggérant ainsi **un rôle pour HO-1 dans le recyclage du fer à partir de ces organes**. De façon intéressante, cette anémie est associée à un état **d'inflammation chronique**, caractérisé par une **sécrétion exacerbée d'immunoglobulines et de cytokines**, après la stimulation des splénocytes par le LPS ou par le CD3/CD28, et par la **déviat**ion concomitante des réponses Th vers un **profil cytokinique de type Th1** (Kapturczak et al., 2004). Dans la rate de ces animaux, aucun mécanisme de compensation *via* une augmentation d'HO-2 n'est observé. D'autre part, ces souris déficientes pour HO-1 sont aussi plus susceptibles aux septicémies polymicrobiales à cause **d'un défaut dans l'élimination des bactéries**. En effet, les souris déficientes pour

HO-1 présentent un défaut de phagocytose des bactéries Gram-positives, qui est dépendant de l'activité du CO, généré par HO-1, puisque les souris traitées avec HO-1 ou au CO montrent une augmentation de la phagocytose et échappent à la septicémie (Chung et al., 2008). **Le premier et unique cas de déficience pour HO-1 humain fut décrit 2 ans plus tard** (Yachie et al., 1999). Le descriptif clinique d'un point de vue immunologique est **similaire entre l'homme et la souris** avec tous les symptômes d'une inflammation chronique (lymphadénopathies et leucocytose), suggérant qu'HO-1 module la réponse inflammatoire de façon similaire entre les deux espèces.

Une question se pose alors, **comment une absence d'HO-1 peut conduire à une inflammation chronique ?**

Différentes hypothèses ont été émises. Par exemple, les souris déficientes pour HO-1 présentes de **forts taux de CCL2 (ou MCP-1)** comparé aux souris sauvages. Cette augmentation du CCL2 représente la signature du phénotype inflammatoire, suggérant un défaut dans le contrôle de l'inflammation par les cellules myéloïdes (Pitcock et al., 2005; Nath et al., 2001).

D'autre part, le CO stimule la **synthèse de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 par les macrophages**, et l'IL-10 est capable d'induire l'expression d'HO-1, suggérant une boucle d'auto-amplification dans l'effet anti-inflammatoire (Otterbein et al., 2000; Lee et Chau, 2002).

B. HO-1 et infections : ami ou ennemi ?

Le rôle d'HO-1 dans les infections virales ou bactériennes est complexe à cause du rôle multifonctionnel de cette protéine. HO-1 peut être **induite par une large variété de bactéries** telles que *Rickettsia rickettsii* (Rydkina et al., 2006), *Streptococcus pneumoniae* (Ren et al., 2007), *Enterohemorrhagic Escherichia coli* (Vareille et al., 2008), *Mycobacterium tuberculosis* (Shiloh et al., 2008; Kumar et al., 2008), *Salmonella enterica* (Zaki et al., 2009) **aussi bien que par des virus** tels que *Kaposi sarcoma-associated herpes virus* (KSHV) (McAllister et al., 2004), and *Hepatitis C virus* (HCV) (Abdalla et al., 2005; Ghaziani et al., 2006). **Cette induction est probablement reliée à une augmentation du stress oxydative et à une inflammation conduisant à la transcription du gène d'HO-1, Hmox-1.**

D'autre part, **l'induction d'HO-1 ou le traitement au CO des souris les protègent contre les maladies infectieuses** induites par *Salmonella enterica* (Zaki et al., 2009), *Plasmodium chabaudi* (Seixas et al., 2009), *Listeria monocytogenes* (Tzima et al., 2009), *Hepatitis B virus* (HBV) (Protzer et al., 2007) et *Pneumococcal meningitis* (Ren et al., 2007).

Cette protection est *in vitro* **directement liée à l'inhibition de la réplication du HBV ou à la multiplication de *Salmonella enterica*** (Zaki et al., 2009; Protzer et al., 2007). Dans certaines autres infections, **l'expression d'HO-1 est exacerbée et empêche les dommages oxydatifs causés par l'hème libre, notamment via les ions Fe^{2+} , en augmentant l'expression de la ferritine qui chélate les ions ferreux**, c'est le cas des infections liées au *plasmodium* ou par *Pneumococcal meningitis* (Ren et al., 2007; Seixas et al., 2009).

Inversement, HO-1 a été montrée **comme facilitant la croissance du pathogène dans certaines infections** par *plasmodium* et au *Mycobacterium tuberculosis* (Sinnis et Ernst, 2008; Epiphanio et al., 2008). Dans ce dernier cas, le CO produit via l'activité d'HO-1 est un fort stimulateur des gènes impliqués dans la mise en phase de latence de la bactérie, qui représente un mécanisme de survie de la bactérie lorsque les conditions sont non favorables à son développement (Shiloh et al., 2008; Kumar et al., 2008). **Concernant les infections par *plasmodium*, le rôle d'HO-1 est donc à double-tranchant** : au début de l'infection, au niveau du foie, l'expression d'HO-1 ou le traitement au CO inhibe l'inflammation en réduisant l'infiltration des macrophages et des neutrophiles permettant au *plasmodium* de se développer dans le foie (Epiphanio et al., 2008), ensuite, au stade de l'invasion des globules rouges par le *plasmodium*, HO-1 est nécessaire à la protection contre l'hème libre relargué lors l'hémolyse des globules rouges, qui est à l'origine du développement de la malaria cérébrale (Pamplona et al., 2007).

C. Le rôle d'HO-1 dans les désordres immunitaires

1. L'allergie

L'observation de la surexpression d'HO-1 dans différents modèles d'allergie chez le rongeur (Willis et al., 2000; Kitada et al., 2001) et les propriétés anti-inflammatoires de cette molécule ont mené à l'hypothèse qu'HO-1 pouvait jouer un rôle protecteur dans les maladies allergiques. En effet, l'augmentation de l'expression d'HO-1 conduit à **une protection significative contre l'inflammation des voies respiratoires dans un modèle murin d'asthme allergique** (Xia et al., 2006). De la même façon, l'induction d'HO-1 inhibe d'autres allergies, telles que des allergies cutanées, chez la souris ainsi que chez l'homme. (Listopad et al., 2007; Kirino et al., 2008). Le mécanisme précis derrière cette protection d'HO-1 n'est pas encore complètement compris. Cela dit, au moins une partie des effets protecteurs d'HO-1 dans l'asthme pourrait dépendre de la dégradation de l'hème libre, ce qui empêcherait les réactions pro-oxydantes et régulerait le tonus vasculaire, la croissance cellulaire et l'apoptose. Cet effet est également associé à l'expansion et le renforcement de la fonction suppressive des populations Tregs $CD4^+CD25^+$ (Xia et al., 2007, 2006).

Cependant, chez le rat, HO-1 agit directement sur la réponse immunitaire en inhibant la dégranulation des mastocytes induite par les immunoglobulines E et la synthèse des cytokines (Takamiya et al., 2002; Yasui et al., 2007).

2. L'auto-immunité

L'autre désordre immunitaire important chez les est associé par l'auto-immunité. La déficience pour HO-1 n'a jamais été associée à une augmentation de l'incidence des maladies auto-immunes spontanées chez l'homme ou la souris. De plus, dans le contexte du diabète, aucune association n'a été faite entre le locus du gène codant pour HO-1 et le locus de susceptibilité au diabète de type 1 chez les souris NOD (modèle murin de diabète de type 1 spontané, voir Résultats). Cependant, **l'induction d'HO-1 réduit les symptômes de l'EAE** alors que les souris déficientes pour HO-1 développent une forme exacerbée de la maladie (Chora et al., 2007). Dans ce modèle, l'infiltration du système nerveux central par les lymphocytes T qui montrent eux-mêmes un phénotype Th non agressif, est réduit après induction d'HO-1. Ce modèle a été récemment complété par l'observation que la forme exacerbée de la maladie est une conséquence de l'absence d'expression d'HO-1 dans les cellules de lignées granulocytes/macrophages (Tzima et al., 2009). De plus, les cellules CD11c+ de ce modèle issues d'animaux traités par HO-1 présentent une capacité de présentation antigénique plus faible associée à une diminution des molécules du CMH-II (Chora et al., 2007).

De la même façon, l'induction d'HO-1 ou le traitement au CO diminue l'incidence du diabète chez la souris NOD pré-diabétique et l'induction d'HO-1 retarde la progression du diabète chez la NOD diabétique (Hu et al. 2007; Li, et al. 2007a; Li, et al. 2007b). Cet effet protecteur est certainement lié aux propriétés anti-apoptotiques, vasculaires et cytoprotectrices générales d'HO-1 ou probablement à une diminution de l'expression du TLR4 par les cellules β du pancréas (voir I-D) (Goldberg et al., 2007). Cependant, HO-1 apparaît aussi agir directement sur le système immunitaire comme le montrent des expériences de transfert adoptif, où les splénocytes issus d'animaux traités au CO ou sur-exprimant HO-1 apparaissent moins diabétogènes dans le modèle de la souris NOD (Hu et al., 2007). Cette protection est associée avec une faible infiltration des lymphocytes T dans le pancréas après l'induction d'HO-1 dans les souris NOD (Li et al. 2007b) ou dans les allogreffes d'îlots pancréatiques chez le rat (Li et al., 2006).

Les bases cellulaires de tels mécanismes sur les maladies auto-immunes ou allergiques restent encore à découvrir. Une fonction généralisée d'HO-1 pourrait inclure une réduction de l'adhésion, du "rolling" et de la migration des cellules inflammatoires à partir des

compartiments vasculaires, certainement en diminuant l'expression et la fonction des molécules d'adhésion sur les parois vasculaires, comme il a été observé chez l'homme et le souris (Wagener et al., 1999, 2001). Cependant, un rôle direct d'HO-1 sur les cellules immunitaires est également possible. En effet, *in vivo*, HO-1 conduit à une présentation antigénique par les DCs altérée (Chora et al., 2007), qui dans un environnement tolérogène (Chauveau et al., 2005) pourrait causer une perte de fonction des cellules T autoréactives (Annexe 1 : (Remy et al., 2009)) et/ou une induction de l'expansion des Tregs (Xia et al., 2007).

D. Les propriétés immunosuppressives d'HO-1 : un atout pour la transplantation

En matière de transplantation, HO-1 améliore la survie de la greffe **via ses effets cytoprotecteurs et anti-inflammatoires locaux au niveau du greffon** mais aussi **via ses effets immunosuppresseurs systémiques**.

Le **rôle protecteur local** d'HO-1 dans le greffon a été initialement démontré en utilisant des cœurs de souris déficientes pour HO-1 comme greffon. Ces cœurs étaient rapidement rejetés après transplantation, alors que les cœurs de souris survivaient indéfiniment (Soares et al., 1998). Plusieurs années plus tard, la capacité d'HO-1 de supprimer le rejet de transplants cardiaques dans un modèle de greffe souris sur rat fut montrée dépendante de la génération de CO (Sato et al., 2001). Cela dit, **le rôle de protection systémique d'HO-1** a aussi été reporté dans un modèle de transplantation cardiaque dans lequel la tolérance est induite par une administration d'anticorps anti-CD40 et par une transfusion spécifique du donneur. En effet, dans ce même modèle, la survie à long-terme dans les animaux déficients pour HO-1 est compromise (Yamashita et al., 2006).

Les effets systémiques et locaux d'HO-1 contre les traumatismes liés à l'ischémie-reperfusion au niveau de l'intestin sont également reportés, notamment après le traitement du receveur au CO (Nakao et al., 2003), l'administration *ex vivo* de CO au niveau du greffon (Nakao et al., 2006), ou l'administration de biliverdine aux receveur, donneur et greffon (Neto et al., 2004). Toutes ces stratégies conduisent à une meilleure survie des animaux comparés aux situations contrôles. Il est important de préciser que dans certains modèles la combinaison du traitement CO et biliverdine favorise la protection contre les traumatismes de l'ischémie-reperfusion, grâce aux actions distinctes de ces deux molécules : le CO améliore le flux sanguins dans le greffon et la biliverdine diminue la peroxydation des lipides (Nakao et al., 2005).

L'effet protecteur local d'HO-1 a été également étudié dans des modèles de rejet chronique d'aortes chez le rongeur (Clarke et al., 2009; Bouche et al., 2002), notamment au

laboratoire. Les aortes du donneur, préalablement transduit avec un adénovirus recombinant codant pour un ADNc humain (AdHO-1) (Bouche et al., 2002) ou prétraitées avec de l'hémine (un inducteur d'HO-1) (Clarke et al., 2009) présentent une diminution significative de l'épaisseur intimale, due à une réduction de l'infiltration des leucocytes (notamment des lymphocytes T) (Clarke et al., 2009) et des cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins (Bouche et al., 2002). De plus, le traitement au CO permet une inhibition plus prononcée de l'infiltration des cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins (Bouche et al., 2002), alors que les aortes traitées avec l'adénovirus Ad-HO-1 présentent une réduction plus importante du nombre de leucocytes aussi bien que de l'expression des molécules de co-stimulation, d'adhésion et des cytokines que celles traitées au CO (Chauveau et al., 2002).

Au laboratoire, dans un modèle de rejet chronique cardiaque chez le rat, différents modes d'administration de l'adénovirus Ad-HO-1 ont été testés : l'injection intragreffon (i.g.), l'injection intramusculaire (i.m.) et l'injection intraveineuse (i.v.). Ces 3 modes d'injection ont conduit à une survie prolongée du greffon. Cela dit, l'injection en intraveineuse donne de meilleurs résultats, suggérant non seulement un effet protecteur d'HO-1 localement sur le greffon mais aussi un effet immunosuppresseur systémique de la molécule (Braudeau et al., 2004). Une amélioration de la survie d'allogreffes cardiaques a aussi été observée après surexpression systémique d'HO-1 en utilisant des souris transgéniques pour HO-1 comme receveur (pour mimer une expression systémique) ou comme donneur (pour mimer une expression locale). Là encore, **la survie est plus longue quand l'expression d'HO-1 est systémique par rapport à une expression locale dans le greffon** (Araujo et al., 2003). Les résultats de ces 2 dernières études suggèrent fortement qu'HO-1 agit donc de façon plus importante en réduisant la réponse immune plutôt qu'en protégeant les cellules du greffon. Ceci a d'ailleurs été mis en évidence dans par **l'inhibition de réactions leucocytaires mélangées (MLR) utilisant des splénocytes de receveurs traités en intraveineuse avec l'adénovirus HO-1** (Braudeau et al., 2004). Dans ces réactions, quand seulement les cellules T purifiées et issues des splénocytes ou des cellules ganglionnaires mésentériques sont utilisées comme stimulatrices, il n'y a plus d'inhibition de la MLR, **suggérant un rôle des cellules non T dans la diminution de la prolifération**, telles que les CPA, par exemple. De plus, l'implication des DC dans les mécanismes immunologiques induits par HO-1 et le CO est aussi reportée dans un modèle de transplantation rénale chez le rat (Kotsch et al., 2007). En effet, le prétraitement du donneur avec un inducteur d'HO-1 ou au CO conduit à une réduction significative de l'expression de ARNm du CMH-II, CD80, CD86, IP-10 et CCL-19 et des 3 sous-unités inductibles de l'immunoprotéasome (LMP2, LMP7 et MECL1) dans la rate du receveur (Kotsch et al., 2007). Par contre, l'expression

intragreffe de toutes ces molécules n'est pas modifiée par le traitement HO-1 ou CO du donneur, suggérant qu'HO-1 et le CO ciblent l'activation et la migration des DCs du donneur.

Comme je l'ai évoqué précédemment, l'utilisation de DCs ou d'autres cellules, comme les cellules souches mésenchymateuses ou embryonnaires, constitue une stratégie de thérapie cellulaire, notamment dans le contexte de transplantation. Là encore, HO-1 joue un rôle dans l'inhibition active de la réponse immunitaire par ces cellules. En effet, au laboratoire, il a été montré dans un modèle de transplantation cardiaque chez le rat que l'injection de DCs immatures syngéniques générées à partir de la moelle osseuse permettait une prolongation de la survie de la greffe (Pêche et al., 2005). Cette survie de l'allogreffe est totalement inhibée par l'administration d'un inhibiteur de l'activité d'HO-1 (Moreau et al., 2009). Dans le même modèle, la survie peut également être améliorée par l'injection de cellules souches mésenchymateuses. Comme pour les DCs, l'inhibition de l'activité d'HO-1 mais aussi celle d'iNOS, induit une perte totale de l'effet protecteur des cellules souches mésenchymateuses, ce qui se traduit par un rejet du greffe (Chabannes et al., 2007). De façon intéressante, dans des réactions leucocytaires utilisant des cellules humaines, seule l'inhibition d'HO-1 (et pas celle d'iNOS) aboutit à une perte des effets suppresseurs des cellules souches mésenchymateuses humaines sur la prolifération allogéniques, suggérant un rôle clé d'HO-1 dans l'immunosuppression des cellules souches mésenchymateuses humaines (Chabannes et al., 2007). De plus, la suppression de la prolifération des cellules T ou des cellules mononuclées du sang périphériques par les cellules souches embryonnaires humaines est également totalement interrompue par l'inhibition de l'activité d'HO-1 (Trigona et al., 2007).

Concernant la transplantation du pancréas, l'induction d'HO-1 dans le donneur chez le rat permet également une survie améliorée de l'allogreffe et une amélioration des fonctions endocrines et exocrines (Becker et al., 2007). De la même façon, l'induction d'HO-1, le traitement à la bilirubine ou au CO du donneur, du receveur ou des deux permet une survie à long terme des îlots pancréatiques transplantés dans un modèle d'incompatibilité partielle du CMH chez la souris (greffes d'îlots de souche DBA/2 (H-2_d) vers B6AF1 (H-2_{b,k/d})) (Wang et al., 2005, 2006). Cette survie à long terme des îlots pancréatiques présentent une tolérance spécifique à l'antigène, puisque toutes les greffes d'îlots provenant d'une 3^{ème} souche de souris sont rejetées, alors qu'une seconde greffe de la même souche que la 1^{ère} greffe est acceptée (Wang et al., 2005). Le mécanisme immunologique impliqué dans les groupes traités au CO implique une réduction de l'infiltration des macrophages concomitante avec une diminution significative des ARNm du CCL2 (MCP-1). Le même type d'allogreffes réalisé dans des conditions d'incompatibilités complètes du CMH (Balb/C (H-2_d) vers C57BL/6 (H-2_b)) montrent que les meilleurs résultats en terme de survie à long terme des greffons d'îlots

pancréatiques sont obtenus avec un traitement combinant l'induction d'HO-1 dans les donneurs ou le traitement au CO des donneurs ou des îlots et le traitement au CO ou à la bilirubine des receveurs (Lee et al., 2007b). Dans ce modèle, HO-1 agit sur la réponse immune en favorisant la migration et la génération *de novo* de cellules Treg Foxp3+ du receveur (Lee et al., 2007b). De plus, les cellules T CD4+CD25+ sont essentielles au maintien de l'efficacité du protocole combiné. Chez le rat, la survie prolongée des allogreffes d'îlots pancréatiques associée avec une faible infiltration des lymphocytes intragreffon est également reportée après la transduction des îlots avec un adénovirus codant pour HO-1 (Li et al., 2006). D'autre part, la combinaison d'HO-1 avec d'autres techniques immunosuppressives telles que l'immobilisation des molécules sur les îlots par le glycol polyéthylène (technique connue pour atténuer la réponse immunitaire) permet de réduire la thérapie immunosuppressive (Lee et al., 2006).

Mise à part un rôle des Tregs ou des macrophages dans l'immunosuppression induite par HO-1, quels autres mécanismes peuvent expliquer le rôle d'HO-1 en contexte de transplantation, notamment pour les îlots pancréatiques ?

L'expression du TLR4 a été impliquée dans l'issue favorable ou non des allogreffes d'îlots. Quand les îlots sont isolés du pancréas, une sur-expression du TLR4 est observée sur la membrane des cellules β pancréatiques en réponse au stress causé par la procédure d'isolation (Goldberg et al., 2007). L'utilisation d'îlots pancréatiques issus d'animaux déficients pour le TR4 induit une survie à long terme de l'allogreffe et une réduction de l'inflammation qui se traduit par une expression intragreffon diminuée de TNF α , iNOS, MCP-1 et Fas. Ainsi, l'exposition des îlots pancréatique au CO pourrait induire une survie à long terme du greffon en bloquant l'expression du TLR4 (Lee et al., 2007b). Cependant, la suppression de la réponse inflammatoire dans le donneur par la déficience en TLR-4 n'est pas suffisante pour empêcher un rejet rapide des îlots, si l'activité d'HO-1 est bloquée chez le receveur. Ainsi, l'activité d'HO-1 est toujours probablement requise pour une réponse anti-inflammatoire efficace chez le receveur. TLR4 est aussi connu pour jouer un rôle important dans le développement de réponses inflammatoires après les traumatismes liés à l'ischémie-reperfusion du rein (Pulskens et al., 2008), du cœur (Kaczorowski et al., 2007, 2009) et du foie (Zhai et al., 2004) ou dans la pathogénèse du rejet chronique d'allogreffes cardiaques (Methe et al., 2004), au moins en partie *via* la production de CXCL-10. Ainsi, une expression réduite du TLR4 pourrait également expliquer le rôle du CO dans la protection lors de l'ischémie-reperfusion. L'activité d'HO-1 ou le traitement au CO peut interférer avec la signalisation du TLR4 en diminuant l'activation de STAT1, *via* la voie de l'IFN de type I, qui induit en retour la production de CXCL-10 (Tsuchihashi et al., 2005, 2007). Chez le macrophage, le CO réduit également la signalisation du TLR4 à travers l'inhibition de la formation des radeaux lipidiques (voir partie2-II-B)

De plus, le gène du TLR4 chez l'homme peut contenir deux SNPs (Asp299Gly and Thr399Ile) différents. Ces 2 mutations caractérisent une perte de fonction du TLR4, causée par une plus faible liaison du LPS au TLR4, alors que l'expression du gène et de la protéine TLR4 reste identique (Arbour et al., 2000; Rallabhandi et al., 2006). Ces mutations du TLR4, dans les transplants rénaux humains, sont associées avec une amélioration immédiate de la fonction du greffon, mais n'a pas d'incidence sur le rejet aigu du greffon. La mutation du TLR4 est aussi lié à une augmentation significative de l'expression d'HO-1 intragreffon, tandis que l'expression du TNF α et du MCP-1 est significativement inhibée (Kruger et al., 2009). Ceci suggère une relation entre le système TLR et HO-1, qui a été précédemment rapporté dans un modèle murin d'ischémie-reperfusion hépatique, les souris déficiente pour le TLR4 présentent un traumatisme réduit suite à l'ischémie-reperfusion par rapport aux souris sauvages (Shen et al., 2005).

Le gène de la protéine HO-1 présente également un polymorphisme, qui a été montré comme améliorant l'issue des allogreffes. En effet, l'expression d'HO-1 est modulée par la présence d'un polymorphisme (GT) $_n$ et d'un SNP (en anglais, Single Nucleotide Polymorphism) (A-413T) dans le promoteur. L'activité du promoteur d'HO-1 est augmentée avec l'allèle courte (GT) $_n$ ou l'allèle A du SNP. La fonction d'allogreffes rénales et la survie (Exner et al., 2004; Ozaki et al., 2008) sont améliorées, tandis que le développement de néphropathie chronique de l'allogreffe (CAN, en anglais, Chronic Allograft Nephropathy) (Courtney et al., 2007) est réduit, quand les transplants rénaux portent l'allèle courte (GT) $_n$. Cependant, ces résultats sont en contradiction avec d'autres études qui ne montrent aucun impact de l'allèle courte (GT) $_n$ sur le rejet aigu ou l'incidence du CAN (Hribova et al., 2008). Cette divergence dans les résultats pourrait être expliquée par la différence de taille des cohortes de patients entre les deux études (Hribova et al., 2008). L'impact du polymorphisme (GT) $_n$ a aussi été étudié dans le cadre d'autres transplantations d'organes. Aucune association avec les allèles (GT) $_n$ n'a été retrouvée dans le développement de vasculopathie des allogreffes cardiaques (Ullrich et al., 2005) ou dans l'issue des greffes de foie (Buis et al., 2008). Cependant, la présence intragreffon de l'allèle A, dans le promoteur d'HO-1 est corrélée avec une meilleure survie du greffon hépatique à 1 an et une perte du greffon, liée à une dysfonction primaire, moins fréquente par rapport au génotype portant l'allèle T (Buis et al., 2008). De façon intéressante, les deux haplotypes les plus fréquemment rencontrés sont l'allèle A combinée à l'allèle longue du (GT) $_n$ et l'allèle T combinée avec l'allèle courte du (GT) $_n$. Ces associations sont étonnante, puisque l'allèle A et l'allèle courte du (GT) $_n$ sont associées avec une plus forte activité du promoteur HO-1. Cependant, en termes d'issue clinique et de niveau d'expression des ARNm HO-1 hépatique, le SNP(A-413) présente un effet dominant sur le polymorphisme (GT) $_n$ (Buis et al., 2008). Ces découvertes fournissent

ainsi une autre explication concernant les divergences de résultats évoquées précédemment, puisque seule la présence des allèles (GT)_n était étudiée.

Tableau 4. Liste des effets HO-1 et/ou de ses produits de dégradation (CO ou bilirubine) dans les immuno-pathologies et la transplantation.

D'après Annexe 2, Blancou et al., Methods in Mol. Biology, 2010

Pathologie/Modèle	Traitement	Mécanismes	Références
Auto-immunité			
1/ Diabète de type 1			
A- Souris NOD:			
1/Traitement préventif	Injection AAV-HO-1 Inhalation CO	-Diminution de la population CMH-II+ -Diminution de la réponse des cellules Th1	(Hu et al. 2007)
2/Traitement curatif	Administration CoPP/SnPP	-Augmentation du niveau des protéines anti-apoptiques dans le pancréas -Augmentation de la survie des cellules β des îlots pancréatiques -Diminution de l'infiltration des DC CD11c+ dans le pancréas	(Li, al. 2007a; Li, et al. 2007b)
B- Modèle de diabète auto-immun induit par les DCs	Inducteur d'HO-1 (CoPP) CO release molecule 2 (CORM2)	-Inhibition de l'immunogénéité des DC -Perte de fonctions des cellules T CD8+ autoréactives.	Annexe 1 : (Rémy et al, 2009)
2/ EAE			
	Souris déficientes pour HO-1 Administration de CoPP Inhalation de CO	-Inhibition de l'expression du CMH-II par les CPA dans le SNC -Inhibition de l'accumulation, la prolifération et de la fonction effectrice des Th et des T CD8 + dans le SNC	(Chora et al. 2007)
	Inhibition conditionnelle de l'expression d'HO-1 dans les cellules myéloïdes (souris HO-1 ^{MD0})	- Activation persistente des CPA - Infiltration exacerbée des Th17 dans le SNC -Réactivité des cellules T spécifiques de la myéline non régressante -Régulation de la production d'IFN-β	(Tzima et al. 2009)
Allergie			
1/ Asthme allergique (Modèle de souris)			
	Inducteur d'HO-1 (Hemin) Inhibiteur d'HO-1 (SnPP)	-Augmentation du pourcentage et des fonctions suppressives des Tregs CD4 ⁺ CD25 ^H , de l'expression des ARNm FoxP3 et du niveau d'IL-10 dans les séra.	(Xia et al. 2006)
	Inducteur d'HO-1 (Hemin) Inhibiteur d'HO-1 (SnPP)	-Augmentation du pourcentage et des fonctions suppressives des Tregs CD4 ⁺ CD25 ^H -Augmentation de l'expression de FoxP3, IL-10 and TGF-β lié à la membrane dans les séra, dans les Tregs CD4 ⁺ CD25 ⁺ spléniques et dans les poumons.	(Xia et al. 2007)
2/ Dermatite atopique (Souris DS-Nh)			
	Inducteur d'HO-1 (Hemin) Inhibiteur d'HO-1 (SnPP)	-Atténuation des lésions de la peau -Augmentation de l'IL18 dans le sérum -Faible niveau d'IgE dans le sérum	(M. Kirino et al. 2008)
3/ Inflammation de la peau			
Modèle murin de : - hypersensibilité de contact induite - hypersensibilité retardée induite			
	Inducteur d'HO-1 (Hemin) Inhibiteur d'HO-1 (SnPP)	-Suppression de l'inflammation dépendante des cellules Th1 et Th2 -Effet dominant de la surexpression d'HO-1 sur les CPA	(Listopad et al. 2007)
Infections			
1/Malaria			
Infection du foie <i>Plasmodium berghei</i> <i>Plasmodium yoelii</i>			
	Souris déficientes en HO-1 siRNA ciblant HO-1 Injection AdHO-1 Inhalation de CO	-Inhibition du niveau de cytokines inflammatoires (Favorise l'invasion du plasmodium au stade de l'infection du foie)	(Pamplona et al. 2007; Sinnis et Ernst 2008)
Malaria Cérébrale Expérimentale <i>Plasmodium berghei</i>			
	Souris déficientes en HO-1 Administration de CoPP Inhalation de CO	-Pas d'inhibition de la parasitose -Prévention de la rupture de la barrière hémato-encéphalique, de la congestion des microvasseaux du cerveau et de la neuroinflammation médiée par les cellules T CD8+ activées en évitant l'oxydation de l'hémoglobine et le relargage de l'hème libre par fixation du CO sur l'hémoglobine.	(Pamplona et al. 2007)
Malaria non cérébrale sévère <i>Plasmodium Chabaudi Chabaudi</i>			
	Souris déficientes en HO-1 Injection AdHO-1 Inhalation de CO	-Pas d'inhibition de la parasitose -Préservation des fonctions hépatiques par les effets anti-oxidants d'HO-1 qui empêche l'apoptose médiée par le TNF des hépatocytes	(Seixas et al. 2009)

2/Infections bactériennes			
<i>Listeria monocytogenes</i>	Inhibition conditionnelle de l'expression d'HO-1 dans les cellules myéloïdes (souris HO-1 ^{MKO})	-En présence de poly I/C : élimination de la bactérie augmentée et survie augmentée des souris HO-1 ^{MKO} causées une réduction de l'apoptose des macrophages médiée par l'IFN de type I	(Tzima et al. 2009)
<i>Salmonella Enterica serovar Typhimurium</i>	SiRNA ciblant HO-1 Inhibiteur d'HO-1 (PEG-ZnPP)	- Sur-régulation d'HO-1 induite par le NO durant l'infection de la <i>Salmonella</i> via la formation de 8-Nitro-cGMP - Défense de l'hôte contre la <i>Salmonella</i> par inhibition d'HO-1 (survie bactérienne et niveau de cellules en apoptose plus importants)	(Zaki et al. 2009)
Méningite à pneumocoques expérimentale	Inhibiteur HO-1 (SnPP)	-Augmentation du fer non-hémique corticale due à une induction d'HO-1 -Prévention des dommages oxydatifs induits par le fer via la sur-régulation de la ferritine indépendamment de l'activité d'HO-1.	(Ren et al. 2007)
<i>Mycobacterium Tuberculosis</i> (MTB)	Souris déficientes pour HO-1 Traitement au CO gaz Inhibiteur HO-1 (SnPP)	-Sur-régulation d'HO-1 dans les macrophages et dans les souris durant l'infection du MTB -Induction des gènes de la mise en phase de latence par le CO (mais pas par le biliverdine ou le fer)	(Shiloh, Manzanillo, et Cox 2008; Kumar et al. 2008; Sinnis et Ernst 2008)
3/Virus infections			
<i>Hepatitis B Virus</i>	Inducteur d'HO-1 (CoPP) Transfert d'AdHO-1	-Réduction de la réplication et de la charge virale hépatique du HBV en interfèrent avec la formation de la capsid	(Protzer et al. 2007)
<i>Paramyxovirus</i> (SeV)	Inhibition conditionnelle de l'expression d'HO-1 dans les cellules myéloïdes (souris HO-1 ^{MKO})	-Altération de la production d'IFN- β et de la phosphorylation de IRF-3 après l'infection macrophagique du SeV.	(Tzima et al. 2009)
Transplantation			
1/ Ischémie-reperfusion			
-Foie a/ Ischémie-reperfusion à chaud (Modèle souris)	Administration du CoPP	-Pas d'effet sur l'expression intrahépatique du TLR4 -Diminution d'IP-10 et des cytokines pro-inflammatoires -Inhibition de la Phospho-STAT1 et de CXCL10	(Tsuchihashi et al. 2005; Tsuchihashi et al. 2007)
	Souris déficientes pour leTLR-4 Administration de SnPP	-Sur-régulation de l'expression intrahépatique du gène d'HO-1 -Inhibition de l'infiltration des neutrophiles -Inhibition de l'expression locale et systemique du TNF- α dans les souris déficientes pour le TLR4. -Inhibition of HO-1 in TLR-4-deficient mice restore I/R damage	(X. D. Shen et al. 2005)
b/ Ischémie-reperfusion (Modèle de rat)	Inhalation du CO (receveur)	-Inhibition des dommages liés à l'ischémie-reperfusion inducés et induits par l'expression de STAT1 et STAT3 - Diminution de la signalisation des voies de MEK/ERK1/2. -Inhibition de l'expression des gènes de la réponse proinflammatoire précoce et liée au stress.	(Kaizu et al. 2008)
-Rein	Inhalation du CO (receveur)	-Inhibition de l'expression des médiateurs pro-inflammatoires -Infiltration macrophagique réduite -Apoptose réduite des cellules épithéliales tubulaires -Sur-régulation du VEGF (vascular endothelial growth factor) via l'activation du (HIF)-1 (hypoxia-inducible factor) en amont	(Neto et al. 2004; Faleo et al. 2008)
-Pancréas	CoPP (donneur)	-Inhibition de l'expression des cytokines pro-inflammatoires -Augmentation de l'expression des cytokines anti-inflammatoires	(Becker et al. 2007)
-Coeur	CO + Biliverdine (traitement combiné)	-Inhibition des traumatismes liés à l'ischémie-reperfusion induits par des médiateurs inflammatoires	(Nakao et al. 2005)

-Intestin	Inhalation du CO (receveur) Solution de préservation saturée au CO Administration de biliverdine	-Augmentation du flux sanguin intragreffon -Inhibition de la surrégulation des médiateurs de l'inflammation -Amélioration du transit et des traumatismes intestinaux	(Nakao et al. 2003; Nakao et al. 2006; Nakao et al. 2004)
	Solution de préservation saturée au CO	-Amélioration du fonctionnement de la barrière intestinale -Augmentation des niveaux intragreffon de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) -Effet protecteur du CO atténué par l'inhibition de la guanylyl cyclase soluble	
	Administration de Biliverdine (donneur-receveur)	-Diminution de l'infiltration des neutrophiles -Amélioration de la force contractile des muscles circulaires intestinaux	
-Poumons (Ischémie-reperfusion à froid)	Solution de préservation saturée au CO	-Amélioration des échanges gazeux -Réduction de l'inflammation intra-greffon (Infiltration cellulaire et des médiateurs inflammatoires réduite)	(Kohmoto et al. 2008)
2/ Rejet aigu			
Modèle de greffon cardiaque (rat)	AdHO-1 recombinant (injection en i.g., i.v. ou i.m.)	- Injection en i.v.: diminution intragreffon du nombre de leucocytes infiltrant, accumulation d'ARNm de cytokine et apoptose dans les cœurs transplantés -Pas immunosuppression générale	(Braudeau et al. 2004)
Modèle de greffon cardiaque (souris)	Souris transgénique pour HO-1 (comme donneur ou receveur) Administration de ZnPP	-Inhibition de la vascularite et de l'infiltrat cellulaire inflammatoire -Inhibition de l'infiltration des lymphocytes CD4(+) et de l'expression du CD25 (HO-1 Tg comme receveur)	(Araujo et al. 2003)
3/ Rejet chronique			
Modèle de greffon aortique (rat)	AdHO-1 recombinant (dans lumière des aortes) Chlorure de Méthylène administré oralement	-Inhibition de l'infiltration des leucocytes et des VSMC -Inhibition des molécules de co-stimulation, d'adhésion et des cytokines	(Bouche et al. 2002; Chauveau et al. 2002)
Modèle de greffon aortique (souris)	Administration d'Hémine en i.p (donneur)	-Inhibition intragreffon de l'infiltration des cellules T -Pas de différence en cellules T activées dans les ganglions lymphatiques drainant	(Clarke et al. 2009)
4/ Ilots pancréatiques – Modèle murin	Administration de CoPP (donneur ou receveur ou les deux)	-Diminution de l'expression intragreffon des ARNm de gènes pro-inflammatoires -Augmentation de l'expression intragreffon des ARNm de gènes anti-apoptotiques	(H. Wang et al. 2005)
	Traitement au CO (donneur ou receveur ou les deux, îlots isolés)	-Suppression de l'infiltration macrophagique intragreffon (traitement du donneur)	
	Administration de bilirubine (donneur ou receveur ou îlots isolés)	-Suppression de l'infiltration macrophagique intragreffon (traitement du donneur)	(H. Wang et al. 2006)
	Administration de CoPP (donneur) Traitement au CO (donneur ou receveur ou les deux, îlots isolés) Administration de bilirubine (receveur)	- Migration et génération <i>de novo</i> des Treg FoxP3+ dérivées du receveur favorisées (Traitement combiné)	(S. S. Lee et al. 2007)
	Inhalation du CO (donneur) Exposition du CO des îlots pancréatiques	-Bloque l'expression du TLR4 par les îlots	(Goldberg et al. 2007)
– Modèle de rat	Transfection avec Ad-HO-1 des îlots pancréatiques	- Inhibition de l'apoptose des îlots - Inhibition de l'infiltration des lymphocytes T dans les îlots greffés	(Y. U et al. 2006)
5- Modèle de tolérance (rat) -induit par les iBMDC du receveur -induit par les cellules souches mésenchymateuses adultes	Inhibition d'HO-1 (SnPP)	-Rupture de la tolérance (prévention <i>in vitro</i> de l'inhibition de la prolifération des cellules T)	(Moreau et al. 2009)
	Inhibition d'HO-1 (SnPP)	-Rupture de tolérance	(Chabannes et al. 2007)

II-Les mécanismes d'action d'HO-1 au niveau des cellules de l'immunité

Pour conclure sur les mécanismes d'HO-1 dans l'immunité, cette partie propose un résumé des implications de cette enzyme sur les différents types cellulaires de l'immunité. Le Tableau 5, à la fin de cette partie, résume les différents effets de l'activité d'HO-1 observés sur les cellules de l'immunité et décrits dans ce chapitre.

A. L'action directe d'HO-1 sur les lymphocytes T

La fonction des cellules T peut être modifiée par soit l'expression endogène d'HO-1 ou les produits extracellulaires dérivés d'HO-1.

Contrairement aux lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ humaines, les cellules T CD4⁺CD25⁺ (Treg) exprime constitutivement HO-1. Cela dit, cette expression d'HO-1 est augmentée par les 2 sous-populations de cellules T par leur activation (Pae et al., 2003). L'inhibition de l'activité d'HO-1 abolit les fonctions suppressives des Tregs sur les cellules T effecteurs (Choi et al., 2005). Cependant, ces résultats ont depuis été contredit par d'autres études, montrant qu'HO-1 n'était pas directement responsable de l'altération de la fonction des Tregs (Biburger et al., 2009; Blancou et Anegon, 2010). Un des résultats les plus convainquant provient de données obtenues à partir de souris déficientes pour HO-1, qui montrent que les Tregs fonctionnent *in vitro* ou *in vivo* normalement (Zelenay et al., 2007). Par contre, les DCs déficientes pour HO-1 abolissent les effets immunosuppresseurs des Tregs (George et al., 2008).

Une autre possibilité serait que les produits dérivés d'HO-1 relargués par d'autres types cellulaires que les cellules T puissent jouer un rôle immunosuppresseur en inhibant l'activation ou la fonction des cellules T. En effet, la bilirubine dérivée d'HO-1 diminue les molécules de co-stimulation sur les lymphocytes T CD4⁺ (Liu et al., 2008) et la biliverdine interfère avec la signalisation des cellules T et supprime les fonctions Th1. De la même façon, la prolifération non spécifique des lymphocytes T est fortement inhibée par le CO délivré sous forme de gaz en comparaison avec les contrôles (Pae et al., 2004; Song et al., 2004). Toutes ces données suggèrent donc que l'activation systémique d'HO-1 pourrait conduire à une dysfonction généralisée des cellules T.

B. L'activité d'HO-1 sur la biologie des macrophages permet la compréhension d'une partie des effets immunosuppresseurs d'HO-1.

Des études *in vitro* ont montré que les macrophages, sur-exprimant HO-1 ou traités au CO et stimulés au LPS, présentaient une production de cytokine pro-inflammatoires (TNF α ,

IL-1 β , MIP-1 α , IL-6) réduite et une production d'IL-10 augmentée (Otterbein et al., 2000; Lee et Chau, 2002; Morse et al., 2003). Ces 2 traitements conduisent aussi à une réduction de l'activité de la NAD(P)H oxydase et du niveau des espèces réactives oxygénées (Kaizu et al., 2008; Courtney et al., 2007). Le CO exerce ses propriétés anti-inflammatoires **à travers la voie des MAPkinases (MAPK p38) (Otterbein et al., 2000) et la cavéoline-1 (cav-1)**. Le mécanisme moléculaire de l'inhibition d'HO-1 et du CO sur l'activation des macrophages par le LPS ont été récemment élucidés. Sous l'activation du LPS, le TLR4 est recruté au niveau des radeaux lipidiques (lipid raft). Le CO exogène inhibe le trafic du TLR4 vers les lipid rafts après la stimulation au LPS (Nakahira et al., 2006), en augmentant l'interaction du TLR4 avec la cavéoline-1 (composant majeur des cavéolaes), ce qui redirige le TLR4 vers les caveolaes, et empêche son association avec les molécules de signalisation permettant la transduction intracellulaire du signal d'activation (Wang et al., 2009). HO-1 agit aussi sur l'activité transcriptionnelle en liant les facteurs de transcription comme IRF-3 et interfère de cette façon avec les voies de transduction des signaux émanant du TLR3/4 (Tzima et al., 2009).

Cependant, la pertinence *in vivo* de cette perte de fonction des macrophages liée à HO-1 nécessite toujours une démonstration, puisque des macrophages péritonéaux issus de souris déficientes pour HO-1 et stimulés au LPS ne présentent pas de défauts fonctionnels (Poss Kd et Tonegawa S, 1997b). Une étude récente, utilisant un système d'expression d'HO-1 conditionnel dans les cellules de lignée granulocyte/macrophage, montre que ces cellules présentent une altération de la signalisation *via* le TLR3 et une altération partielle *via* le TLR4, conduisant à des défauts physiopathologiques très spécifiques (Tzima et al., 2009). Cependant, ces souris ne présentent pas le phénotype décrit dans les souris déficientes pour HO-1, ce qui suggère que l'inhibition de l'inflammation liée à la production naturelle d'HO-1 n'est pas médiée par les cellules de lignée macrophage/granulocyte. De façon intéressante, dans ce système, seule une déplétion mineure de l'expression d'HO-1 dans les DCs est observé (Clausen et al., 1999), suggérant un hypothétique contrôle de l'inflammation par les DCs.

C. Les cellules dendritiques : le lien explicatif des capacités immunosuppressives d'HO-1 ?

Comme je l'ai déjà évoqué, il a été montré, pour la 1^{ère} fois au laboratoire, qu'HO-1 pouvait influencer la fonction des DCs. En effet, la surexpression d'HO-1 par des agents pharmacologiques dans les DCs humaines et de rat cause une diminution du ratio IL-12/IL-10 et une capacité altérée de stimulation allogénique (Chauveau et al., 2005). Nous avons ensuite démontré par des techniques de transfert de gènes ou un traitement par le CO que les effets d'HO-1 sur les DCs *in vitro* étaient liés à sa production de CO et passaient par

l'inhibition de la voie IRF3 (Annexe 1 : (Remy et al., 2009)). La pertinence physiologique de l'immunomodulation *in vivo* des DCs par HO-1 *via* le CO ou la bilirubine est soutenue par l'étude de deux modèles de maladies auto-immunes, dans l'EAE (Chora et al., 2007; Song et al., 2004) et dans le diabète de type 1 (Hu et al., 2007), où le traitement par HO-1 ou la bilirubine altère les fonctions des cellules T autoréactives.

Cela dit, les mécanismes *in vivo* exacts impliqués dans l'immunosuppression induite par HO-1 *via* les DCs ne sont pas encore élucidés. Les DCs modulées par le CO ou HO-1 pourraient avoir un rôle sur l'action :

1/ L'inhibition par HO-1 des fonctions immunogènes des DCs pourrait conduire à l'inhibition des fonctions effectrices des cellules Th en inhibant leur sécrétion d'IFN γ et la réponse Th1 (Chora et al., 2007; Hu et al., 2007) et/ou à l'accumulation des cellules T CD8 $^{+}$ et Th, comme il a notamment été montré dans le système nerveux après induction d'HO-1 dans un modèle d'EAE (Chora et al., 2007). D'autre part, l'inhibition des fonctions (effectrices ou migratoires) des cellules T CD8 $^{+}$ autoréactives est également supposée par nos travaux préliminaires dans un modèle de T1D induit par les DCs (Annexe 1 : (Remy et al., 2009)).

2/ La modulation des DCs par HO-1 pourrait favoriser l'activité suppressive des Tregs sur les T effecteurs (George et al., 2008). Le traitement des DCs par HO-1 inhibe la production des réactifs oxygénés et des molécules pro-inflammatoires telles IL-12, IL-6, TNF α et l'IFN de type I alors que l'IL-10 est préservée (Chauveau et al., 2005) (Annexe 1), ainsi cela représente un milieu favorable pour l'émergence de Tregs.

3/ La dernière possibilité émerge d'un récent papier qui reporte l'existence de T régulateurs CD8 $^{+}$ naturels spécifiques d'un peptide HO-1 (HO212) chez l'homme (Andersen et al., 2009). Ces cellules Tregs CD8 $^{+}$ isolés des lymphocytes du sang périphérique sont très efficaces dans l'inhibition des fonctions lymphocytaires et sont présents à fortes fréquences chez les patients atteints de cancers, comparées aux personnes saines. Cependant, l'impact *in vivo* de ces cellules inhibitrices restent à démontrer.

D'autre part, il est important de souligner que certaines sous-populations de DCs expriment préférentiellement HO-1. En effet, nous avons montré que **l'expression d'HO-1 est restreinte aux populations de DCs spléniques CD4 $^{+}$ OX62 lo** , chez le rat, les DCs CD4 $^{-}$ OX62 hi ne l'exprimant pas. **Les pDCs de rat CD4 $^{+}$ CD11b $^{-}$ fraîchement isolés expriment également HO-1** (Chauveau et al., 2005). Chez la souris, il a récemment été mis en évidence **qu'une large population de DCs spléniques CD8 $^{+}$ exprime fortement HO-1** et que cette expression pourrait jouer un rôle dans la **différenciation de ces DCs**, puisque les souris déficientes pour HO-1 montrent une baisse significative de la proportion des DCs CD8 $^{+}$ spléniques. De plus, l'adressage des précurseurs spléniques CD8 $^{+}$, vers la rate,

apparaît être dépendant de l'expression d'HO-1, puisque seuls les animaux receveurs HO-1+/+ permettent la génération de DCs CD8+ spléniques après injection de précurseurs de DCs spléniques GPF+ HO-1 +/+, contrairement aux souris déficientes pour HO-1 (Park et al., 2010). De façon intéressante, chez l'homme, la sous-population de **monocytes CD14^{hi}CD16^{lo}CCR2⁻**, pourtant « pro-inflammatoires » *in vivo*, **produit HO-1** de façon significative, contrairement aux monocytes CD14^{hi}CD16^{lo}CCR2⁺, qui en produit très peu. De plus, la proportion de monocytes CD14^{hi}CD16^{lo}CCR2⁻ ainsi que le niveau d'ARNm HO-1 sont significativement augmentés chez les patients atteints de la maladie de Kawasaki ou infectés par le virus de l'influenza, suggérant un rôle pour pour cette sous-population de monocytes dans **le contrôle de l'inflammation en produisant l'HO-1 à l'état d'équilibre** (Mizuno et al., 2005)

Tableau 5. Liste des effets de l'activité d'HO-1 sur les cellules immunitaires.

D'après Annexe2, Blancou et al, Methods Mol. Biol., 2010.

Type cellulaire	Espèces	Traitement	Effets	Références
Macrophages	Souris	Induction d'HO-1 (+LPS) Traitement au CO (+LPS)	-Réduction de la production des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , MIP-1 α) -Augmentation de la production de la cytokine anti-inflammatoire IL10	(Otterbein et al. 2000) (T. S. Lee et Chau 2002)
		Induction d'HO-1	-Altération de l'expression de gp91phox et de p22phox -Réduction de l'activité de NAD(P)H Oxidase et du niveau des ROS	(Taille et al. 2005)
		Traitement au CO (+LPS)	-Réduction de l'activité de NAD(P)H Oxidase et du niveau des ROS -Inhibition de la translocation du TLR4 dans les « lipid raft » -Suppression des interactions entre TLR4 et TRIF/MyD88 -Inhibition de l'activation des facteurs transcriptionnels (NF- κ B, IRF-3) (mais pas avec poly I/C) -Réduction de l'expression du gène IFN- β (mais pas avec poly I/C) -Réduction de la production d'IP-10 et de RANTES (mais pas avec poly I/C)	(Nakahira et al. 2006)
		Inactivation d'HO-1 (+ LPS or poly I/C)	-Altération de l'induction des gènes codant pour RANTES, IP-10, et MCP-1 -Réduction de l'activation d'IRF3 -Altération de la production d'IFN- β	(Ghaziani et al. 2006)
Cellules Dendritiques	Humain Rat Souris	Induction d'HO-1 (+LPS) Traitement au CO (+LPS)	-Inhibition de la phosphorylation d'IRF-3 -Réduction des niveaux de ROS -Inhibition de la maturation phénotypique (CD80, CD86...) -Inhibition de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (IL-12, IL-6, TNF- α , IFN- β) -Augmentation ou maintenance de la production d'IL-10 -Altération des capacités stimulatrices	(Listopad et al. 2007; Chauveau et al. 2005) Annexe 1 : (Rémy et al. 2009)
	Rat	HO-1 induction (+LPS)	-Réduction de l'expression des ARNm du CD80, CD86 et des 3 sous-unités inductibles du protéasome, i.e. LMP2, LMP7 and MECL1	(Kotsch et al. 2007)
	Mouse	Souris déficientes pour HO-1	-Altération de la fonction suppressive des Tregs	(George et al. 2008)
Lymphocytes T (autres que Treg CD4+CD25+)	Humain	Induction d'HO-1 Traitement au CO	-Inhibition de la phosphorylation d'ERK (CD4+) -Inhibition de la production d'IL-2 (CD4+) -Inhibition de la progression du cycle cellulaire (CD4+) -Inhibition de la prolifération cellulaire CD8+ et CD4+	(Pae et al. 2004) (Pae et al. 2003)
	Souris	Traitement au CO	-Suppression de la prolifération des lymphocytes -Inhibition de l'activité des caspases	(Song et al. 2004)
CD4+CD25+ Treg	Humain	Activation Anti-CD3/CD28	-Surexpression d'HO-1	(Pae et al. 2003)
		Transfection du gène FoxP3 Inhibition d'HO-1	-Induction de l'expression d'HO-1 -Perte de l'activité immunosuppressive	(B. M. Choi et al. 2005)
	Souris	Induction d'HO-1	-Pas de modification dans l'expression de FoxP3 -Augmentation de la prolifération des Tregs -Pas de modifications de l'activité immunosuppressive	(Biburger et al. 2009)
		Souris déficientes pour HO-1	-Pas de corrélation entre l'expression de FoxP3 et d'HO-1 dans les cellules T CD4+ -Pas de modification de l'activité immunosuppressive	(Zelenay et al. 2007; George et al. 2008)
		Induction d'HO-1	-Augmentation de l'expression de FoxP3 -Augmentation de l'expression l'IL-10 et du TGF- β -Augmentation de l'activité immunosuppressive	(Xia et al. 2007)
Mastocytes	Rat	Induction d'HO-1	-Réduction de la dégranulation induite par les IgE -Diminution de l'adhésion des leucocytes dépendante des mastocytes	(R. Takamiya et al. 2002)

Objectifs de la thèse

L'étude d'HO-1 et de ces produits de dégradation, tels que le CO dans le domaine de la transplantation a largement été développé au laboratoire, comme j'ai pu le décrire précédemment. La découverte que des cellules non T pouvaient être les médiateurs immunitaires des mécanismes HO-1 dans le cadre d'allogreffes cardiaques chez le rat (Braudeau et al., 2004) ont conduit à l'étude de l'expression d'HO-1 au niveau des DCs. Les premiers travaux de l'équipe, comme je l'ai déjà mentionné, ont montré que certaines populations de DCs expriment préférentiellement HO-1, notamment les DCs humaines dérivées des monocytes et les BMDCs de rat. L'induction *in vitro* de la maturation de ces DCs par le LPS inhibe l'expression d'HO-1. Ainsi, le fait d'induire l'expression d'HO-1 via le CoPP dans les BMDCs de rat ou les DCs humaines dérivées des monocytes a permis de les rendre réfractaires à la maturation par le LPS, ce qui se traduit par une inhibition de l'expression des marqueurs de maturation phénotypiques (CD80, CD86, CD83, CMH-I), de la production de cytokines pro-inflammatoires, comme IL-12p70 et permet l'inhibition de la prolifération des cellules T allogéniques. Cependant, les DCs traitées au CoPP gardent la capacité de produire l'IL-10 (Chauveau et al., 2005).

Plus récemment, nous avons tenté de comprendre les mécanismes intracellulaires développés par les DCs humaines et responsables de l'inhibition de la maturation au LPS, non seulement après induction d'HO-1 par le CoPP ou le transfert de gène codant pour HO-1, mais aussi après traitement des DCs au CO. L'effet d'HO-1 et du CO a également été étudié après maturation des DCs humaines *via* l'activation du TLR-3, par le poly I/C. Cette étude a montré que le CO est le seul produit de dégradation issu de l'activité d'HO-1, qui permet une inhibition de la maturation (phénotypiquement et fonctionnellement) : ni la biliverdine, ni la bilirubine, ni la chélation du fer par la déféroxamine (DFO), qui mime l'effet de la ferritine induite par la libération de Fe²⁺, ni l'apport d'hème n'ont d'effets sur le phénotype et le profil cytokinique des DCs, tout du moins des DCs humaines. L'étude des voies de signalisation intracellulaire a permis de mettre en évidence que ni la sur-expression d'HO-1, ni le CO n'ont un effet sur la phosphorylation induite par le LPS de la MAPK p38 et de JNK, pourtant impliquées dans d'autres types cellulaires comme les macrophages ou les cellules endothéliales. La phosphorylation induite par le LPS de ERK est très faiblement inhibée par la surexpression d'HO-1 mais l'inhibition de la voie d'ERK n'empêche pas les effets inhibiteurs d'HO-1 suggérant que la voie ERK ne reproduit pas les effets d'HO-1 sur la maturation des DCs (Annexe 1 : (Remy et al., 2009)).

Le TLR3 et le TLR4, comme nous l'avons vu, activent les voies intracellulaires dépendantes du TRIF, responsables de l'activation de NF-κB et de l'IRF-3. Le TLR4 est,

cependant, le seul de ces 2 TLRs à activer les voies intracellulaires dépendantes de MyD88, qui induisent uniquement le NF- κ B. De façon intéressante, dans les DCs humaines, nous avons montré que seule la surexpression d'HO-1, contrairement au CO, inhibe l'activation de NF- κ B induite par le TLR4. L'activation de l'IRF-3 par le TLR4 est, elle, inhibée par le CO et HO-1, ce qui est aussi retrouvé pour les BMDCs de souris, dont la production d'IL-12p70 est inhibée par le traitement au CO ou l'induction d'HO-1. Après la stimulation du TLR3, le traitement au CO ou l'induction d'HO-1 inhibent la production de l'IP-10 par les DCs humaines. Ceci suggère donc que l'activation de l'IRF3 par le TLR3 est également inhibée par le CO et HO-1 (Annexe 1, (Remy et al., 2009)). Cependant, chez la souris, seule l'induction d'HO-1 permet une inhibition de l'activation de l'IRF-3, puisque seule une induction d'HO-1 inhibe la production d'IP10 par les BMDCs de souris après une stimulation du TLR-3, suggérant un effet inhibiteur du CO différent selon l'espèce étudiée. Ce ne sont pas les seules différences inter-espèces rapportées. En effet, alors que HO-1 et le CO inhibent la production du TNF- α induite par le LPS par les DCs de souris et de rat, cette inhibition dans les DCs humaines est beaucoup moins efficace (Annexe 1, (Remy et al., 2009)). Ces différences pourraient trouver leur origine dans les conditions de culture *in vitro* utilisées pour générer les DCs, comme nous le verrons plus tard dans la discussion.

Nous avons également montré que le CO et HO-1 inhibent sur la fonction immunogène des DCs *in vivo* dans un modèle murin de T1D induit par les DCs. En effet, le traitement au CO et l'induction d'HO-1 des DCs de souris permet une protection des animaux contre le développement du T1D. Le transfert de gène codant pour HO-1 dans les DCs de souris permet une protection de 50% des animaux contre le développement du T1D (Annexe 1, (Remy et al., 2009)).

Au vue de ces résultats, mon travail de thèse a donc été de comprendre les mécanismes impliqués dans cette perte d'immunogénicité, et éventuellement dans la perte de capacités tolérogènes, des DCs traitées au CO ou sur-exprimant HO-1 dans ce modèle de T1D.

Parallèlement, je me suis également intéressée à l'implication d'HO-1 et du CO dans les mécanismes de cross-présentation. En effet, nous avons également montré que l'induction d'HO-1 dans les DCs inhibe la production des réactifs oxygénés induits par le LPS (Chauveau et al., 2005). Ces réactifs oxygénés sont, en grande partie, produits par la NADPHoxydase. Etant donné que cette enzyme est largement impliquée dans les mécanismes de cross-présentation, comme je l'ai expliqué dans l'introduction et qu'une de ses sous-unités, la gp91phox, contient deux hèmes, l'interaction d'HO-1 et du CO avec cette molécule est une hypothèse qui nous a conduits à nous intéresser à l'implication d'HO-1 dans la cross-présentation.

RÉSULTATS

I- Etude du rôle du CO dans la protection contre l'auto-immunité *via* les DCs : le diabète auto-immun de type I.

A. Mise au point du traitement au CO gaz

Au laboratoire, le traitement des cellules au CO est obtenu par une molécule relarguant du CO, nommée CORM (en anglais, CO-releasing molecule). L'action de cette molécule est contrôlée par l'iCORM, qui est une forme inactivée du CORM et qui ne relargue pas de CO dans le milieu. Pour valider nos résultats par une seconde technique, nous avons tenté de développer une technique de traitement des cellules par le CO sous forme de gaz. Nous avons testé deux types de gaz : un mélange gazeux contenant 450ppm de CO et 0,5% de CO₂ et un gaz contenant uniquement du CO (CO pur). Nous avons également testé plusieurs possibilités de traitement au gaz. : une chambre à CO hermétique (avec le mélange gazeux - traitement réalisé à 500ppm à l'intérieur de la chambre) et l'injection de CO par pulse *via* une aiguille directement dans le milieu (avec le mélange gazeux ou le CO pur, à un débit de 0,5L/ml). Pour évaluer la quantité de CO induite par ces différentes techniques, nous avons traité des échantillons sanguins et déterminé le pourcentage de carboxyhémoglobine formé à la suite des différents traitements. Nous avons constaté que seul le traitement en pulse par le CO pur permet une importante libération de CO et par conséquent une formation massive de carboxyhémoglobine, jusqu'à atteindre environ 100% de carboxyhémoglobine avec un pulse de 1 minute. Inversement, le mélange gazeux CO 450ppm + CO₂ permet l'incorporation de quantités très faibles de CO, comme le montre la Figure 21. En effet, une faible augmentation du taux de carboxyhémoglobine (6% de carboxyhémoglobine avec la technique par pulse de 10 minutes dans les échantillons) voire aucune augmentation du taux carboxyhémoglobine (entre 1 à 2% de carboxyhémoglobine avec la chambre hermétique et le CORM) n'est détectée en comparaison avec les échantillons non traités au CO (de 0,4% à 1,9% de carboxyhémoglobine détectée). Nous nous trouvons donc dans ces conditions à la limite du seuil de détection de la machine qui est d'environ 1% de carboxyhémoglobine détectable.

La question qui se pose au vue de ces résultats est quel impact peut avoir un tel apport de CO sur les DCs ?

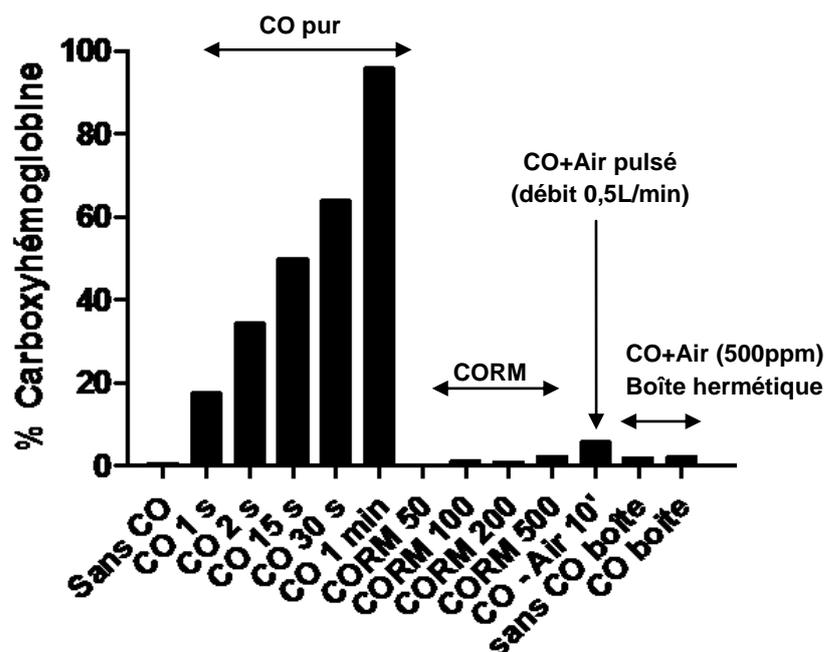


Figure 21. Taux de carboxyhémoglobine relevés à partir d'échantillons sanguins traités au CO par différentes techniques.

Le taux de carboxyhémoglobine est évalué à partir d'échantillons sanguins après traitement de 1, 2, 15, 30 secondes ou 1min avec du CO pur sur glace, après traitement d'une heure au CORM à 50, 100, 200 ou 500 μ M et après traitement par un mélange gazeux contenant 0,5% de CO₂ et 450ppm de CO soit par pulse de 10min à un débit de 0.5L/min sur glace, soit en chambre hermétique pendant 2h à 37°C.

Nous avons décidé d'évaluer l'efficacité de notre traitement en fonction de l'inhibition de la production d'IL-12p70 après maturation au LPS et traitement des DCs par ces différentes techniques, puisque ce sont les résultats que nous obtenions après induction d'HO-1 ou traitement au CORM des DCs. Nous avons également évalué la production d'IL-10 à la suite de ces mêmes traitements. Nous avons donc traité les DCs, soit par pulse de CO pur ou de mélange gazeux sur glace directement dans le milieu contenant les cellules, soit en plaçant les DCs en culture à 37°C dans une chambre hermétique contenant une quantité de 500ppm de CO, puis le LPS est ajouté pour une maturation d'environ 16h. Les surnageants sont récoltés et dosés par ELISA pour l'IL-12p70 et l'IL-10. La Figure 22 et la Figure 23 présentent un résumé des différents résultats que nous avons obtenus pour chaque technique.

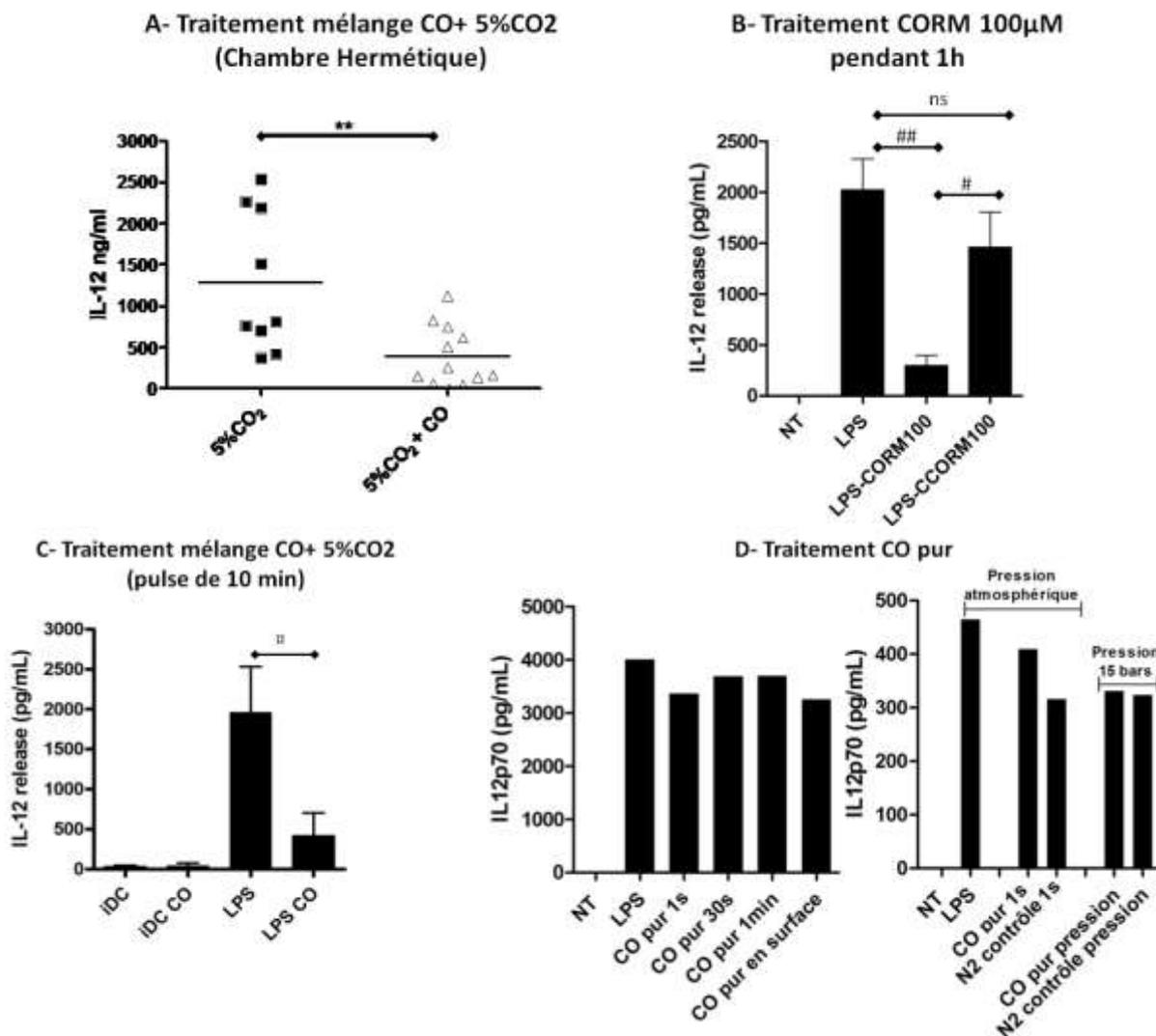


Figure 22. Evaluation de la production d'IL-12p70 par les DCs après les différents traitements au CO gaz et au CORM.

(A) Production d'IL-12p70 par les DCs après maturation au LPS et traitement en chambre hermétique pendant 2h avec le mélange gazeux contenant 5% de CO₂ et 450ppm de CO. Dans la chambre, la quantité de CO ambiant est de l'ordre de 500ppm. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à un t-test non paramétrique Mann-Whitney, $p=0.0095 < 0.05$ et regroupent 8 à 9 expériences indépendantes (B) Production d'IL-12p70 par les DCs après traitement pendant 1h avec du CORM à 100 μ M avant maturation au LPS. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à un test ANOVA one-way non paramétrique, suivi d'un post-test de Dunn's; $p < 0.05$ et regroupent 6 expériences indépendantes (C) Production d'IL-12p70 par les DCs après maturation au LPS et traitement par pulse de 10 minutes avec un mélange gazeux contenant 5% de CO₂ et 450ppm de CO, le débit du CO dans le milieu est de 0,5L/min. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à un t-test non paramétrique Mann-Whitney, $p=0.0152 < 0.05$ et regroupent 5 expériences indépendantes (D) A gauche, production d'IL-12p70 par les DCs après maturation au LPS et traitement au CO gaz pur (par pulse de 1 seconde, 30 secondes, 1 minutes ou en surface) ($n=1$). A droite, production d'IL-12p70 par les DCs après maturation au LPS et traitement au CO gaz pur, soit avec un pulse d'une seconde en condition atmosphérique, comme précédemment, soit sans pulse mais sous une pression de 15 bars ($n=1$).

Pour toutes ces conditions, la viabilité des cellules a été vérifiée par marquage au DAPI et est supérieure à 90%. La concentration de LPS pour toutes ces expériences est de 0,5 μ g/ml.

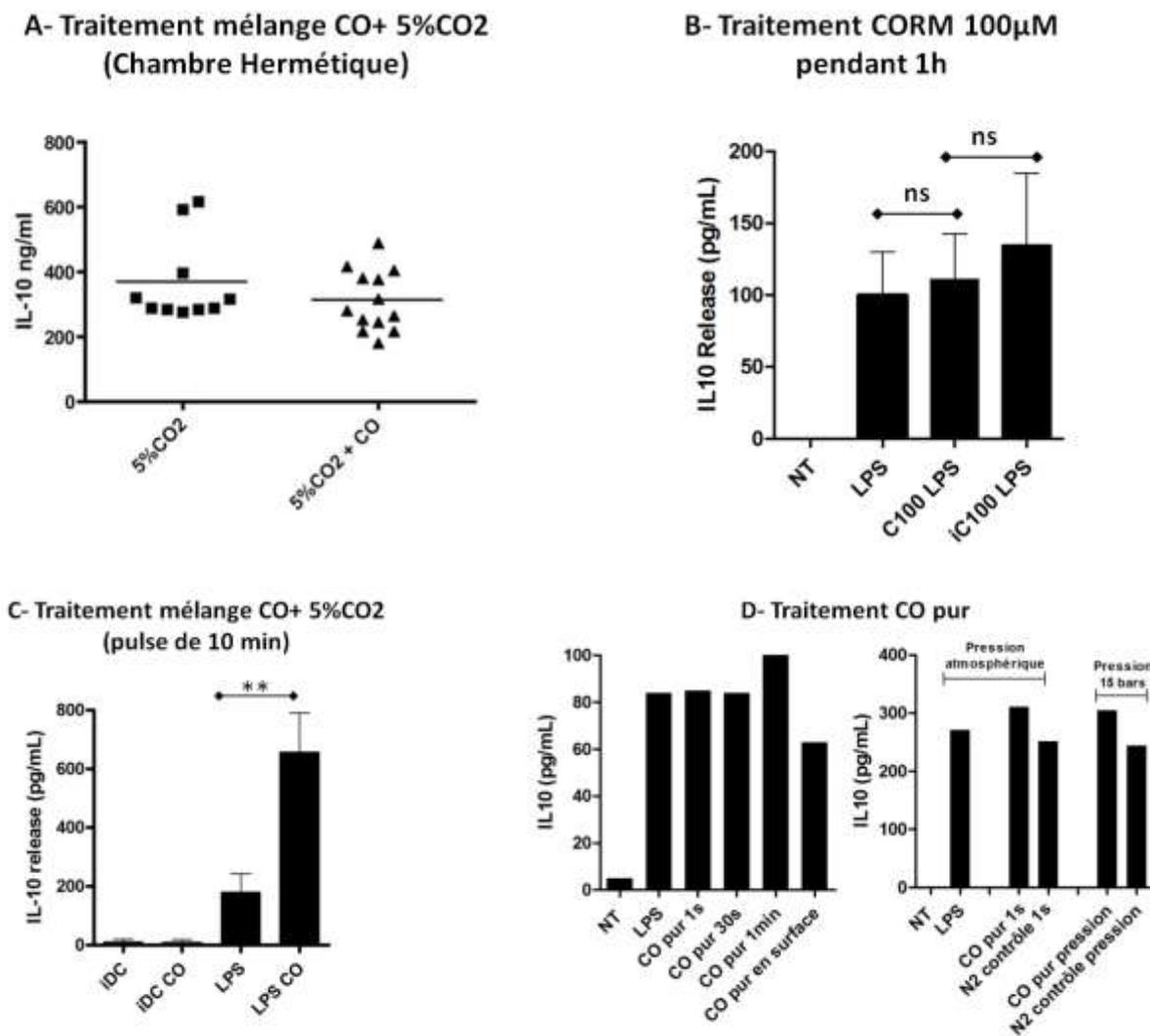


Figure 23. Evaluation de la production d'IL-10 par les DCs après les différents traitements au CO gaz et au CORM.

(A) Production d'IL-10 par les DCs après maturation au LPS et traitement en chambre hermétique pendant 2h avec le mélange gazeux contenant 5% de CO₂ et 450ppm de CO. Dans la chambre, la quantité de CO ambiant est de l'ordre de 500ppm. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à un t-test non paramétrique Mann-Whitney, p=0.23 et regroupent 8 à 9 expériences indépendantes (B) Production d'IL-10 par les DCs après traitement pendant 1h avec du CORM à 100µM avant maturation au LPS. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à un test ANOVA one-way non paramétrique, suivi d'un post-test de Dunn's et regroupent 5 expériences indépendantes (C) Production d'IL-10 par les DCs après maturation au LPS et traitement par pulse de 10 minutes avec un mélange gazeux contenant 5% de CO₂ et 450ppm de CO, le débit du CO dans le milieu est de 0,5L/min. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à un t-test non paramétrique Mann-Whitney, p=0.0081 < 0.05% et regroupent 6 expériences indépendantes (D) A gauche, production d'IL-10 par les DCs après maturation au LPS et traitement au CO gaz pur (par pulse de 1 seconde, 30 secondes, 1 minutes ou en surface) (n=1). A droite, production d'IL-10 par les DCs après maturation au LPS et traitement au CO gaz pur, soit avec un pulse d'une seconde en condition atmosphérique, comme précédemment, soit sans pulse mais sous une pression de 15 bars (n=1).

Pour toutes ces conditions, la viabilité des cellules a été vérifiée par marquage au DAPI et est supérieure à 90%. La concentration de LPS pour toutes ces expériences est de 0,5µg/ml.

De façon étonnante, nous avons observé que seules de très faibles quantités de CO (à l'image de ce qu'il se passe avec le CORM) permettaient une inhibition de la production de l'IL-12p70 par les DCs, le CO pur n'induisant aucune modification de la production d'IL-12p70 (Figure 22-D gauche). En effet, seuls les traitements avec le mélange gazeux (en chambre ou en pulse) (Figure 22-A et C), nous ont permis d'obtenir une inhibition de l'IL-12p70, comparable à ce qu'on obtenait avec le CORM (Figure 22-B). Parallèlement, nous observons que la production d'IL-10 est maintenue quelque soit le traitement CO utilisé (Figure 23- A, B et D), à l'exception du traitement par pulse de 10min avec le mélange gazeux (CO + 5% CO₂) qui induit une augmentation significative de la production d'IL-10 par les DCs après maturation au LPS (Figure 23-C). Dans notre idée, le fait de pulser directement le CO gaz dans le milieu de culture représentait une solution pour induire une meilleure solubilisation du gaz dans le milieu. En effet, contrairement au CORM, qui relargue directement le CO dans le milieu de culture et au contact des DCs, le traitement au CO gaz atteint plus difficilement les cellules car le gaz se solubilise très mal dans le milieu. Pour tenter de pallier cette difficulté sans entrer directement en contact avec les DCs (qui pourrait être la critique de cette méthode), nous avons essayé de changer les conditions de pression lors du traitement au CO. Ceci a été réalisable avec le CO pur, qui se présente sous forme de bonbonne à une pression de 15bars. Pour cette expérience, nous avons utilisé comme contrôle un gaz inerte, l'azote (N₂). Aucune différence en production d'IL-12p70 par les DCs n'a été détectée quelque soit la méthode utilisée (pulse à pression atmosphérique ou solubilisation du CO par forte pression) entre le CO pur et le gaz inerte, même si on note une baisse non significative et négligeable de la production d'IL-12p70 avec par rapport à la condition LPS (Figure 22-A droite)

En conclusion, compte tenu du fait que l'utilisation du CO pur présente un certain risque pour l'utilisateur et induit de trop fortes quantités de CO pour avoir un impact bénéfique sur la biologie des DCs et que la méthode par pulse de CO en mélange gazeux ne reproduit pas exactement les résultats précédemment obtenus avec le CORM (augmentation significative de l'IL-10), nous avons donc poursuivi toutes nos expériences *in vivo* en utilisant la chambre à CO hermétique (et le traitement CORM), qui permet de préserver l'intégrité des DCs et montrent les mêmes résultats que le traitement au CORM en matière d'inhibition de la production d'IL-12p70 et de maintien de la production de l'IL-10 par les DCs et en quantité de CO fournies (très faible par rapport au test de carboxyhémoglobine). Cela dit, nous testerons plus tard s'il existe un impact du CO sur les DCs, lorsqu'il est induit à de fortes concentrations mais que la production de l'IL-12p70 n'est pas inhibée.

B. Le modèle murin de diabète auto-immun induit par les DCs

Notre modèle est basé sur des souris ins-HA, dont l'expression du peptide HA (Hémagglutinine) de l'influenza est sous le contrôle du promoteur à l'insuline. Ces souris expriment donc ce peptide uniquement au niveau des cellules β du pancréas. Des cellules T CD8+ autoréactives spécifiques du HA₅₁₂₋₅₂₀ sont injectées à ces souris. Le jour suivant, les mêmes souris reçoivent une injection de DCs traitées ou non au CO (gaz ou CORM), maturées au LPS et chargées avec le peptide HA₅₁₂₋₅₂₀. La mise au point du modèle a permis de définir la quantité optimale de DCs nécessaires au développement du diabète. La Figure 24 montre que la quantité minimale pour l'induction du diabète auto-immun chez la souris immunisée est de 15 000 DCs. Cette quantité de DCs permet l'induction du diabète de la totalité des animaux traités, 6 à 9 jours après l'immunisation.

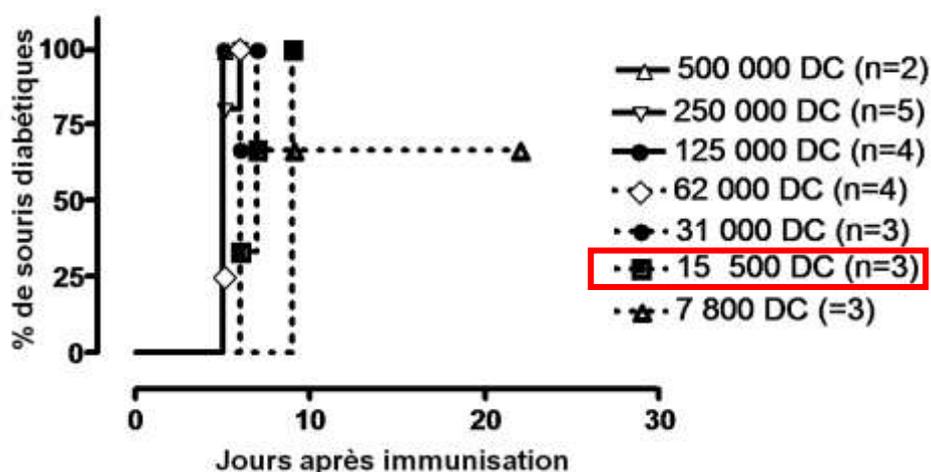


Figure 24. Mise au point du modèle murin de diabète auto-immun induit par les DCs.

L'induction du diabète est médiée uniquement par les DCs chargées avec le peptide HA₅₁₂₋₅₂₀ d'intérêt et après maturation avec le LPS. En effet, la Figure 25 montre que seules les DCs traitées au LPS et chargées avec le peptide HA₅₁₂₋₅₂₀ induisent le diabète, alors que les DCs immatures chargées avec le peptide HA₅₁₂₋₅₂₀ ou les DCs maturées chargées avec le peptide contrôle de la nucléoprotéine de l'influenza NP₁₄₇₋₁₅₅ ne le déclenchent pas. Le diabète dans ce modèle est donc déclenché de façon restreinte au peptide d'intérêt et par des DCs immunogènes.

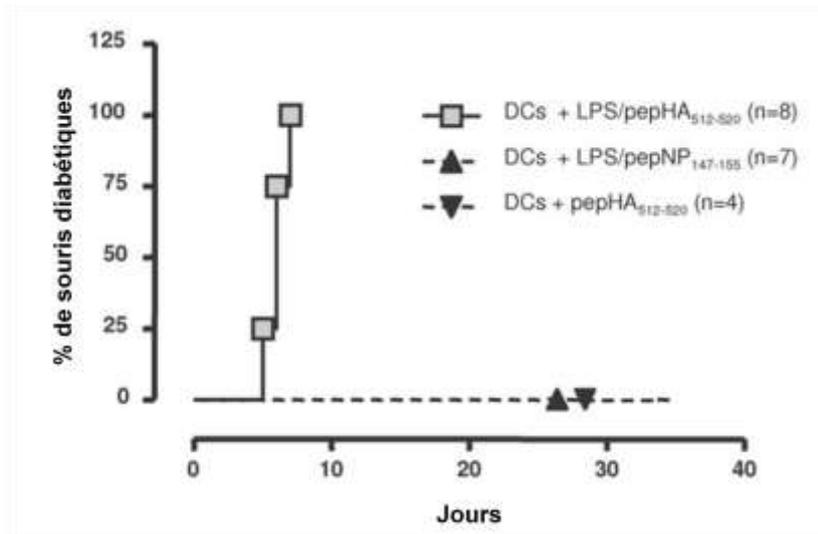


Figure 25. Les groupes contrôles du modèle de diabète.

C.Article

“Carbon Monoxide treated DC induces normal peripheral autoreactive CD8+ T cell function but impairs their migration into the pancreas”

Sylvie Pogu*, Virginie Tardif*, Thomas Simon, Kévin Rigaud, Séverine Rémy, Eliane Piaggio, Nicolas Escriou, Jean.-Marie Bach, Ignacio Anegon et Philippe Blancou

*Co-premier auteurs

En cours de soumission

Résumé de l'article

La plupart du monoxyde de carbone (CO) produit naturellement dans l'organisme provient de l'activité de l'hème-oxygénase (HO). Le traitement au CO améliore l'issue pathogénique dans les maladies auto-immunes spontanées ou induites ou dans le cadre d'allogreffe en favorisant la tolérance. Les mécanismes cellulaires impliqués dans de tels processus restent inconnus. Dans cette étude, nous montrons qu'une seule et unique immunisation avec des cellules dendritiques (DCs) traitées au CO sous forme de gaz (COg) et chargées avec un peptide de l'insuline est suffisante pour induire un délai dans l'apparition du diabète chez les souris NOD, suggérant que les DCs jouent un rôle clé dans la tolérance induite par le CO. Ce délai est associé avec une inhibition de l'infiltration de cellules mononucléaires dans le pancréas et un défaut en périphérie des lymphocytes T autoréactifs pathogènes. Dans le but d'obtenir une meilleure compréhension des mécanismes immunologiques en jeu, nous avons développé un modèle de souris transgéniques dans lesquelles le diabète est déclenché par les DCs. Les souris ayant reçu une injection de DCs traitées au CO *ex-vivo* et chargées avec des peptides des îlots β du pancréas sont protégées contre le diabète induit. L'effet des DCs traitées au COg sur les cellules T CD8+ autoréactives est restreint au peptide et indépendant de l'IL-10 et des cellules T CD4+. De façon surprenante, aucune différence n'a été observée dans la prolifération, la sécrétion de l'IFN- β et l'activité cytotoxique *in vivo* des cellules T CD8+ autoréactives entre le groupe immunisé avec des DC traitées au COg et le groupe immunisé avec des DCs non traitées. Cependant, les cellules T CD8+ autoréactives sont tolérisées après la stimulation avec les DCs traitées au COg et leur migration vers le pancréas est fortement inhibée. Ainsi, l'immunothérapie utilisant des DCs traitées au CO apparaît comme une stratégie originale dans le contrôle des maladies auto-immunes en inhibant, de façon spécifique, la migration des cellules T CD8+ pathogéniques.

Carbon monoxide-treated dendritic cells induce normal peripheral autoreactive CD8⁺ T cell function but impairs their migration into the pancreas

Short title: carbon monoxide treated DC impairs autoreactive CD8 migration

Sylvie Pogu^{a,b,c,1}, Virginie Tardif^{d,e,c,1}, Thomas Simon^{d,e,c}, Kevin Rigaud^{a,b,c,d,e},
Séverine Rémy^{d,e,c}, Eliane Piaggio^f, Nicolas Escriou^g, Jean-Marie Bach^{a,b,c}, Ignacio
Anegón^{d,e,c} and Philippe Blancou^{a,b,c,2}

^a ONIRIS, UMR_A 707 IECM, Nantes, F-44300, France;

^b INRA, Nantes, F-44307, France;

^c Université Nantes Angers LeMans, France;

^d INSERM, UMR 643, Nantes, F44093 France;

^e CHU Nantes, ITUN, Nantes, F44093 France;

^f UMR7211-UPMC/CNRS-CERVI Hôpital Pitié Salpêtrière, Paris

^g Unité de Génétique Moléculaire des Virus Respiratoires, URA 1966 CNRS, Institut Pasteur, 25 rue du Dr. Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

¹ First co-authors

² Corresponding author: Philippe Blancou, Immuno-Endocrinology UMR_A 707, ONIRIS, Atlanpole La Chantrerie, 44307 Nantes Cedex 3, France. Tel: +33-240-687-721. Fax: +33-240-687-805. Email : blancou@oniris-nantes.fr

Classification: BIOLOGICAL SCIENCES Immunology

Author contributions. PB, SP, VT, TS, SR and KR performed research experiments, collected and analyzed data. EP and NE provided analytical tools. JMB and IA supervised research. IA and PB formulated the hypothesis and aims, designed the experiment, provided funding and analyzed data. PB wrote the paper.

ABSTRACT

Most of the carbon monoxide (CO) naturally produced in the body arises from heme oxygenase (HO) activity. CO treatment improves pathogenic outcome in induced or spontaneous autoimmune diseases or in allotransplantation by promoting tolerance. The cellular mechanism underlying such properties remains unknown. Here, we show that a single immunization with dendritic cells (DC) treated with CO as gas (COg) and loaded with insulin peptide is sufficient to delay diabetes incidence in NOD mice suggesting that DC play a pivotal role in CO-induced tolerance. This delay is associated with the inhibition of mononuclear cell infiltration in the pancreas and reduced pathogenic autoreactive T-lymphocytes in the periphery. To get a better understanding of immunological mechanisms at play, we developed a transgenic mouse model where DC trigger diabetes. Protection against induced diabetes is provided when these mice received *ex-vivo* -treated DC loaded with beta-islet pancreas peptides. The effect of COg-treated DC on autoreactive CD8⁺ T cells is shown to be peptide restricted, IL-10 and CD4⁺ T cells independent. Surprisingly, no difference was noted in *in vivo* autoreactive CD8⁺ T cell proliferation, IFN- γ secretion or cytotoxic activity in the untreated vs COg-treated DC immunized group. However, autoreactive CD8⁺ T cells were tolerized after stimulation by COg-treated DC and their migration to the pancreas was strongly inhibited. Thus, immunotherapy using CO-treated DC emerges as an original strategy in controlling autoimmune disease by specifically inhibiting pathogenic CD8⁺ T cell migration.

INTRODUCTION

Autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, and type 1 diabetes (T1D) are mainly chronic and impact quality of life more than life expectancy. Current therapeutic of T1D is based on daily injection of insulin. Even if insulin delivery methods are improving, this treatment does not perfectly adjust glycemia resulting in hyperglycemic events ultimately leading to cardiovascular complications. In this context, conventional immunosuppression offers only partial benefit at the price of frequent and sometimes serious adverse events (review on immunotherapeutics in diabetes). Recent immunotherapeutic trials have focused on systemic immunoregulation protocols with success exemplified by anti-CD3 antibody treatment (Herold et al., 2005; Luo et al., 2010). However, by affecting indiscriminately the pathogenic autoimmune process, together with beneficial immune responses, they can also be saddled with serious side effects. An attractive alternative is to use antigen-specific approaches to selectively silence autoreactive T cells. As pivotal player in T cell activation, DC have been extensively studied to induce peptide-specific tolerance.

A recently promising approach has emerged using carbon monoxide (CO) as tolerizing agent. Most of CO naturally produced in the body arises from heme oxygenase (HO) activity. Among HO, HO-1 is the only isoform that is inducible. HO-1 is a stress-responsive protein whose expression is induced by various oxidative agents. This enzyme has shown cytoprotective, antioxidant and anti-inflammatory properties. The lack of the gene coding this enzyme (Hmox1) in mouse leads to dramatic inflammation characterized by generalized blood cells infiltration and follicular hyperplasia (Poss Kd and Tonegawa S, 1997). Interestingly, clinical picture of human and murine HO-1 deficiency (Yachie et al., 1999) is strikingly similar with all the symptoms of chronic inflammation suggesting that HO-1 activity modulates the inflammatory response in a similar fashion in both species. HO-1 K.O. animals are also more susceptible to inflammatory diseases. As instance, induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in Hmox1 K.O. mice led to enhanced neurological symptoms as compared with wild type mice (Chora et al., 2007). Consistently, up-regulation

of the HO-1 pathway has also a significant protective effect against induced (Chora et al., 2007) and spontaneous (Hu et al., 2007; Li et al., 2007a) autoimmune diseases as well as against allergy (Xia et al., 2006). Several reports have also shown that overexpression of HO-1 and CO treatment can be beneficial to graft survival (Bach F et al., 1997; Braudeau et al., 2004; Chauveau et al., 2002; Hancock et al., 1998; Soares et al., 1998). The precise underlying mechanisms for HO-1- based protection are not yet completely understood, but appear to involve heme degradation products, such as carbon monoxide (CO). Thus, HO-1 and in particular CO has then not only anti-inflammatory and cytoprotective functions but also tolerogenic actions in adaptive immune responses. The tolerogenic functions of HO-1 do not seem to depend on the expression of HO-1 by CD4⁺CD25⁺ Tregs but rather indirect effects of HO-1 produced by other cell types and acting on T effector cells as well as on Tregs [for review see (Blancou et al., 2010)(Blancou and Anegon, 2010)]. In an attempt to elucidate this mechanism, we have shown that immature DCs express HO-1 and that HO-1 overexpression inhibits the LPS-induced immunogenicity of human, rat and mice DCs (Chauveau et al., 2005; Remy et al., 2009). Moreover, we have recently demonstrated that not only HO-1 but also CO modify polyI:C (TLR 3 ligand) and LPS (TLR-4 ligand)-induced DC maturation leading to decreased phenotypic maturation and proinflammatory cytokine production with conserved IL-10 production (Remy et al., 2009). An analysis of the intracellular signaling pathways showed that HO-1 and CO in DCs inhibit the phosphorylation of IRF-3 (Remy et al., 2009).

In the present study, we have evaluated the therapeutic efficacy of dendritic cell treated with CO as gas (COg) at the induction phase of a spontaneous T1D model and assessed their mechanisms of action in a bitransgenic mouse model. We have found that a single dose of COg-treated DC is sufficient to inhibit diabetes incidence in NOD mice colony and that this treatment inhibit autoreactive CD8⁺ T cells migration into the pancreas of transgenic mouse model of diabetes.

RESULTS

CO-treated DC lower diabetes incidence in NOD colony.

Several reports have shown that HO-1 systemic overexpression (Hu et al., 2007; Li et al., 2007a) or *in toto* CO inhalation inhibits diabetes induction in spontaneous T1D mice (NOD mice) (Hu et al., 2007). However the mechanism that could account for T1D inhibition by HO-1 or CO is not yet defined. Recent experimental data point toward a role of CO in the induction of tolerogenic DC (Biburger et al., 2009; Blancou and Anegeon, 2010; George et al., 2008). We hypothesized that treatment of DC with CO would not only reduce immunogenicity (Remy et al., 2009) but also induce tolerance in T1D. To this end, we administered COg-treated DC loaded with insulin-derived peptide to NOD mice. One of the major and necessary peptides to trigger diabetes in NOD colony is H2-K^d restricted insulin peptide B₁₅₋₂₃ (InsB₁₅₋₂₃) (Nakayama et al., 2005). The development of diabetes in NOD mice occurs as a result of the early development of lymphoid cell infiltration around the islets at around 3 to 5 weeks of age and a late event wherein beta-cell destruction occurs several months later.

Bone marrow derived DC were cultured in normal NOD mouse serum in order to avoid FBS tolerization process as described (Kadri et al., 2007). LPS-matured CD11c⁺ cells loaded with InsB₁₅₋₂₃ peptide, were treated or not with CO as gas (COg) and intravenously administered to 4 to 5 week old NOD mice. Two hours of *in vitro* treatment of DC by COg (300-450 ppm) was non-toxic to the cells as determined by flow cytometry analysis of physical parameters and 7-actnimycin D staining 24-hours post culture (data not shown). No statistical difference in diabetes induction were observed between peptide-loaded mDC (LPS-matured DC) and PBS injected NOD mice ($p=0.656$) confirming the absence of unspecific FBS-mediated tolerization (**Fig.1A**). Incidence curves show that a single injection of InsB₁₅₋₂₃ peptide loaded and COg-treated DC promotes tolerance in NOD colony when compared to non-treated DC ($p=0.011$) or PBS ($p=0.0095$) injected mice. Histological analysis of DC-immunized NOD mice at nine month of age reveals not only a decrease in β -islet density but also a lower

infiltration profile amongst the remaining islets (**Fig. 1B**). This result suggests that COg-treated DC promote tolerization towards β -islet antigens and lowered diabetes incidence. To examine the occurrence of pathogenic autoreactive T cells, we transferred splenocytes from NOD mice tolerized with COg-treated DC and untolerized animals to NOD-SCID recipients (**Fig. 1C**). NOD-SCID animals receiving splenocytes from NOD protected animals showed significantly lower diabetes incidence after transfer than unprotected animals ($p < 0.001$) demonstrating that pathogenic effect of autoreactive T-lymphocytes is decreased when mice received COg-treated DC. Altogether, these results demonstrate that a single administration of COg-treated DC is sufficient to dramatically reduced diabetes incidence in a spontaneous model of autoimmune disease suggesting that pathogenic autoreactive T cells are inhibited. This effect on DC may not only explain at least partially the protection observed when mice are treated with COg (Hu et al., 2007) or HO-1 inducer (Hu et al., 2007; Li et al., 2007a) but also is also a potential therapeutic strategy more easily adaptable to clinical application vs. *in vivo* COg administration.

DC treated with COg inhibit their immunogenic capacities toward autoreactive CD8+ T cells in a peptide specific manner

Several explanations can be put forward to explain the capacity of COg-treated DC to induce tolerance in NOD mice. Based on the major role of autoreactive CD8⁺ T cell in diabetes (Blancou et al., 2007) we have decided to favor the hypothesis that COg-treated DC tolerized pathogenic CD8⁺ T cells. In order to be able to dissect the cellular mechanism involved in CO-induced tolerance, we have used a bitransgenic mouse model where autoimmune diabetes is induced by DC and CD8⁺ T cells. Mice expressing influenza hemagglutinin (HA) in pancreatic β -cells (InsHA mice) were transferred with naïve anti-HA₅₁₂₋₅₂₀ CD8⁺ T cells from TcR transgenic CL4 mice. In this experimental setting we have shown that diabetes can be induced by HA₅₁₂₋₅₂₀ loaded peptide LPS-matured DC 6-9 days after immunization (Remy et al., 2009). However when DC are treated with the CO-releasing molecule (CORM-2) and used to immunized InsHA mice, diabetes was not induced (Remy et al., 2009).

Treatment of DC with physiological form of COg led to the inhibition of IL-12 secretion (**see supporting information (SI), Fig. S1 A**) as observed with CORM-2 (Remy et al., 2009) reinforcing the idea that DC function is modified by CO. We next assessed whether COg-treated DC could also inhibit the immunogenicity of DC and thus in this model autoimmune diabetes (**Fig. 2A**). COg-treated DC loaded with relevant (HA₅₁₂₋₅₂₀) peptide did not trigger diabetes, as observed previously with CORM-treated DCs (Remy et al., 2009). These results indicate that not only pharmacological agent can modify DC phenotype but also the physiological form of CO.

We then asked whether the inhibition by COg-treated DC of CD8⁺ T cell responses was peptide specific and could be exerted as bystander suppression. Mature DC loaded with irrelevant peptide and treated with CO were unable to inhibit diabetes when mice were co-transferred with DCs loaded with the relevant peptide (HA₅₁₂₋₅₂₀) (**Fig. 2B**). These results indicate that tolerization by COg-treated DC is peptide restricted and did not induce non-specific bystander suppression

The effect of COg-treated DC on CD8⁺ T cells is CD4⁺CD25⁺ Tregs independent and IL-10 independent.

Some authors have described the inhibition of CD8⁺ T cell function by the means of CD4⁺CD25⁺ Tregs specially in the context of diabetes (Luo et al., 2010). We challenged the hypothesis that COg-mediated loss of pathogenicity of autoreactive CD8⁺ T cells could be mediated by CD4 Tregs by depleting CD4⁺CD25⁺ T cells in recipients before and during diabetes induction. A complete CD4⁺CD25⁺ depletion was achieved after three injection of anti-CD25 mAb (**SI, Fig. S2**). A CO-mediated resistance to diabetes was observed even when CD4⁺ Tregs were absent (**Fig. 2C**).

Finally, as IL-10 secretion is preserved in mouse when DC are treated with COg (**Fig. S1 B**) or CORM-2 (Remy et al., 2009), we questioned the contribution of IL-10 secretion by DCs in CO-mediated resistance to diabetes. IL-10 deficient DC were however as effective as wild

type-DC to modify CD8⁺ T cells function and to abrogate diabetes development (**Fig. 2D**) demonstrating that IL-10 is dispensable for CO-mediated CD8⁺ T cells modification.

COg-treated DCs show normal *in vitro* CD8⁺ T cells priming and function

To explain that COg-treated DC are not immunogenic (Remy et al., 2009) and decreased diabetes incidence in autoimmune diabetes it can be hypothesized that these effects are due to impaired CD8⁺ T cell priming, lack of cell expansion, deletion or anergy. These hypothesis are strengthen by the observation of cytokine secretion disruption of COg-treated DC (Remy et al., 2009).

To test priming, CO-treated or untreated DC were treated with LPS, loaded with HA₅₁₂₋₅₂₀ and used to present antigen peptides *in vitro* to anti-HA CD8⁺ T cells. Surprisingly, although all DCs preparations used showed > 50 % inhibition of LPS-induced IL-12 release upon treatment with CO (data not shown), no difference were observed in CD8⁺ T cells proliferation (**Fig. 3A**) or IL-2 secretion (**Fig. 3B**). Same results were obtained for IFN- γ secretion and at low peptide concentration or DC: CD8⁺ ratio (data not shown). Analogously, expression of CD25 and CD69 early activation markers by CD8⁺ T cells was not affected (**Fig. 3C and D**). Similar results were obtained with CO releasing molecule (100 μ M) in 3 experiments (data not shown).

CO-treated DCs show normal *in vivo* CD8⁺ T cells priming and function

In order to have an *in vivo* picture of CD8⁺ T cells priming by CO-treated DC, we transferred HA-specific CFSE-loaded CD8⁺ T cells genetically tagged with Thy1.1⁺ marker in InsHA mice before DC immunization. We have already shown that, in this experimental setting, COg-treated DCs inhibit diabetes by contrast to untreated DCs ((Remy et al., 2009) and Fig.. 2A). Eleven days after immunization, mesenteric, pancreatic lymph node and spleen cells were harvested. Autoreactive CD8⁺ T cells priming, proliferation and functions were assessed in recipient mice and compared between CO-treated DC or untreated-DC immunized groups. CD44 activation marker was comparable in CO-treated or untreated DC group suggesting

identical priming of autoreactive CD8⁺ T cells (**Fig. 4A and B**). Based on CFSE dilution, the percentage of donor cells that divided once in recipient mice was similar in COg-treated DC and untreated-DC immunized group (data not shown). The redistribution and numbers of donor CD8⁺ T cells were also comparable in both groups (**Fig. 4C and D**).

Even if autoreactive CD8⁺ T cell activation is identical in CO-treated DC and untreated-DC immunized group, their function could however be different. To address this point, CD8⁺ T cell function was evaluated by IFN- γ secretion and *in vivo* CTL assay. Intracellular staining for IFN- γ was assessed on splenocytes and pancreatic lymph nodes after stimulation using HA₅₁₂₋₅₂₀ loaded DC. Comparable levels of IFN- γ secretion were noted between the two groups both in terms of percentage (data not shown) or numbers of IFN- γ ⁺ donor cells in spleen and pancreatic lymph nodes (**Fig. 5A and B**). We next tested the capacity of autoreactive CD8⁺ T cell to exert cytotoxic activity directed to peripheral splenocytes target. To measure CTL activity directly, an *in vivo* CTL assay was performed in which two populations of BALB/c splenocytes differentially labeled with CFSE ('CFSE^{low}' and 'CFSE^{high}' populations). CFSE^{high} cells were loaded with relevant peptide (HA₅₁₂₋₅₂₀) whereas CFSE^{low} cells were loaded with irrelevant peptide (NP₁₄₇₋₁₅₅) both were transferred in equal number into the immunized mice. *In vivo* CTL activity was determined based on the selective reduction in ratio of relevant peptide-loaded cells to unloaded cells reisolated from the spleen 12 h after injection. We did not observe any difference in terms of cytolytic function whether CD8⁺ cells were activated with COg-treated DC or untreated DC (**Fig. 5C and D**). Similar results were obtained with CO releasing molecule (100 μ M) twice (data not shown). Altogether, these results show that modification of autoreactive CD8⁺ T cells effector function by CO-treated DC was not mediated by clonal deletion, anergy or functional inactivation.

CO-treated DC tolerize autoreactive CD8⁺ T cells.

To investigate the potential of COg-treated DC to tolerize CD8⁺ T cell *in vivo*, we challenged normoglycemic InSHA mice from the COg-treated DC group with a second transfer of fully

immunogenic DC (**Fig. 6A**). In contrast to the control group, all challenged mice in the COg-treated DC group remained diabetic free (group “LPS/HA/CO” at day 0 followed by “immunogenic DC” at day 10) whereas all mice in the control group (“PBS” at day 0 followed by “immunogenic DC” at day 10) developed diabetes. These results indicate that in the control group autoreactive CD8⁺ T cells were still present 10 days after adoptive transfer and could be activated by immunogenic DCs resulting in diabetes whereas CO-treated DCs induced *in vivo* tolerance of CD8⁺ effector cells. When influenza virus was used to challenge COg-treated DC immunized mice, tolerance was also observed demonstrating that autoreactive CD8⁺ T cells tolerance is achievable in virus-induced inflammation context (**Fig. 6B**). To explore the capacity of CO-tolerized CD8⁺ T cells to inhibit activated CD8⁺ T cells to destroy pancreatic β -cell (dominant tolerance), we transferred *in vitro* activated autoreactive CD8⁺ T cells (Tc1) in COg-treated DC tolerized mice at 13 days after the immunization. Even though the attack of the pancreas by Tc1 cells was highly pathogenic in InsHA mice, as previously described (Vizler et al., 2000), transfer in COg-treated DC tolerized recipients delayed diabetes by 2 to 3 days ($p < 0.001$, **Fig. 6C**). Altogether, these results demonstrate that COg-treated DC dominantly tolerizes autoreactive CD8⁺ T cells.

Autoreactive CD8⁺ T cells primed by COg-treated DC show impaired pancreatic migration

As diabetes incidence is significantly different from CO-treated vs untreated DC immunized group, we asked whether the infiltration of autoreactive CD8⁺ T cell was impaired. The histological analysis of the pancreas eleven days following COg-treated or untreated DC immunization showed that the severity of insulinitis was correlated with the development of disease (**Fig. 7A**). In contrast to control mice, in which only ~5% of examined islets were normal, ~42% of examined islets were not infiltrated in COg-treated DC immunized mice. Interestingly, despite full protection from diabetes, pancreatic islets from COg-treated DC mice group still exhibited mononuclear cell infiltration indicating that COg-treated DCs do not tolerize the entire pool of autoreactive CD8⁺ T cells or that part of the CD8⁺ T cells acquired

local regulatory activity. To have a more detailed picture of infiltrated cells in the pancreas, we have isolated pancreas infiltrated lymphocytes and analyzed this fraction by flow cytometry. Significant higher numbers of donor cells were present in untreated vs. COg-treated DC immunized mice (**Fig. 7B**, $p=0.007$, Mann-Whitney t-test).

Interestingly, bitransgenic model of DC-induced diabetes reproduces what has been observed in NOD mouse model namely the inhibition of pancreatic mononuclear cell infiltration after immunization with COg-treated DC. Moreover this model shows this anti-inflammatory effect of COg-treated DC is associated with lower autoreactive CD8⁺ T cell infiltration that may explain the lower incidence of diabetes.

DISCUSSION

Studies on immune disorders reveal that by enhancing systemic HO-1 expression, or delivering CO, one of its end products, is possible to prevent allergy (Kirino et al., 2008; Listopad et al., 2007; Xia et al., 2006) as well as autoimmune diseases like T1D (Hu et al., 2007) or multiple sclerosis (Chora et al., 2007). At least part of the protective effect of HO-1 in these diseases may depend upon the prevention of free heme from participating in pro-oxidant reactions, and in regulating vascular tone, cell activation and growth or apoptosis. In the present study, we have explored the effect of CO from the immunological perspective in T1D. We have shown that a single injection of *in vitro* COg-treated DC loaded with peptide autoantigens is sufficient to lower spontaneous diabetes incidence and β -islet aggression by decreasing pathogenic effect of autoreactive T-lymphocytes. This phenomenon observed may be part of the protective effect observed against T1D when NOD mice are treated by HO-1 inducers or CO inhalation (Hu et al., 2007; Li et al., 2007b). DCs play a major role in the initiation and maintenance of autoimmune diseases. In the absence of inflammation, immature DCs (iDCs) located in peripheral tissues continuously capture innocuous and cell-associated self-antigens and migrate to draining lymph nodes where they can induce tolerance (Morelli and Thomson, 2007; Steinman et al., 2003). Processing and presentation of self-antigens by steady-state DCs are now thought to be major components of the maintenance of immune tolerance in the periphery. Nevertheless, tolerance can also be obtained by DC with a mature phenotype and cytokine production favoring tolerogenic vs. immunogenic cytokines (ie IL-10 vs. IL-12), as is the case for COg-treated and LPS matured DCs. The lymphoid compartment where this tolerogenic antigen presentation takes place in our model needs to be investigated but spleen and pancreatic lymph nodes are major sites of DC migration upon i.v. delivery (Creusot et al, 2009).

The mechanism underlining such properties is still to be determined. DC can polarize many different immune cell types among which some are involved in T1D pathogenic process like CD4, CD8⁺ and NK T cells. Since the pathogenic role of autoreactive CD8⁺ T cells in β -cell

aggression has been documented both in NOD mouse model (Amrani et al., 2000; Graser et al., 2000; Trudeau et al., 2003; Wicker et al., 1994; Wong et al., 1996) as well as in humans (Blancou et al., 2007) and thus we decided to focus our study on this cell type. This choice is strengthened by the fact that we have recently shown that CO-treated DC by a CO-releasing molecule leads to decrease of IL-12/IL-10 ratio and loss of *in vivo* DC immunogenicity toward CD8⁺ T cells in mice (Remy et al., 2009). We have observed the same cytokine secretion profile (**Fig. S1**) and effect on immunogenicity when DCs are *in vitro* treated with COg (**Fig. 2A**). These results corroborate the idea that HO-1, by the release of CO, inhibits TLR induced DC immunogenicity.

The effect of CO on CD4 T cell response has received considerable attention with a controversy on the role of the expression of HO-1 in this cell type that has recently turn to the advantage of an indirect effect of HO-1 on CD4⁺ T cells cell *via* DC (Blancou and Anegon, 2010; Blancou et al., 2010). On the other hand, the effect of CO on CD8⁺ T cell remains poorly studied. We were able to show that COg-treated DC did not modify *in vivo* CD8⁺ T cell functions (proliferation, IFN- γ secretion or CTL capacities) but rather inhibit their capacity to migrate to the pancreas. Interestingly, this inhibition of CD8⁺ migration has already been observed in pancreas after systemic induction of HO-1 by pharmaceutical inducer (Li et al., 2007a) without much attention. The mechanisms explaining impairment of CD8⁺ T cell migration in the pancreas are to be determined by future experiments. Another interesting question that will need to be answered is whether this inhibition of migration is organ-specific or whether these cells have a generalized defect of migration to other inflamed tissues.

Some authors have shown that the absolute absence of IL-12 secretion by DC during priming leads to defect of CD8⁺ secondary response (Ye et al., 2008) in accordance with our results showing that mice are refractory to diabetes when challenged by different means (**Fig. 6A and B**). However it is surprising to observe that mice that received COg-treated DCs are also more resistant to CTL-challenge, which suggests the emergence of a Treg function, as previously described in other cell systems such as OVA OT-I cells using IL-10-

treated DC (Noble et al., 2006). One possibility is that CD8⁺ T cells primed by CO-treated DC lose their effector functions and gain regulatory T cell function. To demonstrate this last point, CD8⁺ T cells primed by CO-treated DC need to be transferred into induced or spontaneous diabetes model. Another possibility is that CO-treated DC amplified CD4⁺ Treg population that help to block pathogenic CD8⁺ T cells but this is unlikely since depletion of CD25⁺ T cells did not abrogate the effect of COg-treated DC.

COg-induced tolerance could be an interesting approach for immunotherapy of autoimmune disease. Several antigen-specific strategies have already been devised to promote deletion or anergy of pathogenic autoreactive T cells (Brocke et al., 1996; Raz et al., 2001; Sela, 1999), or to convert them into innocuous or even regulatory cells (Apostolou and von Boehmer, 2004; Luo et al., 2010; Piaggio et al., 2007). Several additional steps are however needed before implementing a CO-induced tolerization therapy in humans. These include the ongoing identification of major self-peptides recognized by pathogenic T cells in T1D, which should be delivered with COg-treated DC. Another possibility could be to induce CO-tolerized DC *in vivo*. An interesting approach would be to induce HO-1 expression or use CO releasing molecules in CD103⁺ dermal DC which are capable of cross presentation (Bedoui et al., 2009). In any event, immunomodulation by CO treatment of DC emerges as a promising alternative for organ-specific autoimmune diseases.

MATERIALS AND METHODS

Mice, Virus.

The InsHA transgenic mice (Lo et al., 1992) express HA of the influenza virus in pancreatic islets and the TCR-HA₅₁₂₋₅₂₀ transgenic mice (Morgan et al., 1996) express a TCR-specific for the H2K^d restricted (IYSTVASSL) epitope of HA (CL4 mice). InsHA and CL4 mice were obtained through CDTA (Departement de Cryopréservation, Typage et Archivage Animal) Orléans, France). NODL_{tj} mice (from Jackson Laboratory, Bar Harbor, MA) and NOD-SCID (from Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were maintained at the ONIRIS mouse breeding facilities (France). All animal breeding and experiments were performed under specific pathogen-free (SPF) conditions in accordance with the European Union Guidelines. Influenza A/PR/8/34 (PR8, H₁N₁) virus was produced on embryonated eggs and displayed 400 HA unit/ml (by hemagglutination assay) and 8.8x10⁸ pfu/ml. Virus was diluted in PBS to obtain 12.5 HA unit per injected dose.

Cell preparation, culture and treatments.

Mouse DC. Bone marrow cells were cultured in RPMI medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin and 50 mM 2-ME (all from Eurobio, les Ulis, France), 10 ng/ml of recombinant mouse GMC-SF (Preprotech, Roky Hill, NJ) and 10% FCS (Hyclone, UK) or 2% NOD mouse serum for NOD bone marrow DC. At day 6, a positive selection of iDCs (purity >95%) was performed by magnetic cell sorting using mouse CD11c microbeads (Miltenyi Biotech) according manufacturer instruction (BSA was replaced by NOD mouse serum for NOD CD11c+ sorting).

Treatment of DCs. iDCs were treated either with tricarbonyldichlororuthenium (II) dimer ([Ru(CO)₃]₂, CORM2 as described (Remy et al., 2009) or with CO as gas (air with 5% CO₂ and 500 ppm of CO) in CO-chambers. Briefly, iDC were treated with 100 μM of CORM (extemporaneously diluted) one hour before and 3 hours after addition of LPS, washed one

hour after the last pulse and used as described. For CO as gas, cells were incubated 2 hours with LPS in 24-wells Nunc plate in 60 L anesthetic chamber filled with air with 5% CO₂ and 500 ppm of CO (controlled by CO-detector). Negative control consist of the inactive form of CORM2 (iCORM, [Ru(DMSO)₄]₂) with the only substitution of carbonyl group (release as CO) by DMSO and air with 5% CO₂ respectively. DC maturation was induced by 0.5µg/ml of LPS (*Escherichia coli* O111:B4; Sigma-Aldrich). DCs were pulsed with peptide (5µM, Sigma-Aldrich) and washed thoroughly. For all experiments involving CO-treatment of DC, viability and IL-12 secretion was determined 24 h after culture using 7-ActinoAminomycine-D (7-AAD) staining and ELISA (see below) respectively. In all experiments presented, 24 h viability was above 90% and IL-12 secretion inhibition higher than 50%. CO-treatment as gas and CORM show the same IL-12 inhibition profile on bmDC as well as conserved maturation markers (CD80/CD86/CD40) and IL-10 secretion capacity (**Fig. S5**).

Flow cytometry.

Lymphocytes from different organs were stained with anti-CD8 (clone 53-6.7), anti-CD44 (clone IM7), anti-CD25 (clone PC61), anti-CD69 (clone H1.2F3), anti-CD90.1/Thy1.1 (clone OX-7) and anti-IFN-gamma (clone XMG1.2). Staining was assessed using a FACSaria flow cytometer and Diva 6.1 software (Becton Dickinson). PE-labeled mouse anti-IgG1 Ab (Immunotech) was used as a negative control.

***In vitro* proliferation assay**

1 x 10⁵ CD8⁺ T cells from CL4 mice were sorted and cultured with different range of CD11c⁺ treated or not with CO or CORM in round bottom 96-wells culture plates in five replicates. After 3 days, 100 µl of supernatant was removed per well and frozen for cytokine determination. Splenocyte proliferation was quantified by incubation with 1 µCi/well of [³H]Thymidine (Amersham, Saclay, France) for an additional 18 h. [³H]Thymidine incorporation was measured by beta scintillation counting using a liquid scintillation counter (LS7500, Beckman, Villepinte, France).

Cytokine measurement.

Mouse ELISA kits were used for IL-12p70, IL-10, IL-2 and IFN-gamma (BD Pharmingen).

Diabetes.

Diabetes in NOD mice. Bone marrow from NOD mice were culture in 2% NOD mouse serum (NMS) with recombinant mouse GM-CSF. CD11c⁺ cells were sorted after six days of culture, treated or not with CO as gas (2h at 500 ppm) with LPS (0.5 µg/ml) and Insulin B₁₅₋₂₃ peptide (5 µM). PBS or 2.5 x 10⁵ CD11c⁺ cells were administered to NOD female mice at 4 to 5 weeks of age. Mice were monitored diabetes development for 56 weeks. Mice were considered diabetic when they were at least positive for glycosuria two times in a row (with Clinistix urinalysis strips (Bayer) > 5.5mmol/L) and confirmed by glycemia (with Glucose RTU[®] kit (Biomérieux, France), > 250mg/dl) at the time of sacrifice.

Diabetes in NOD-SCID mice after transfert. For adoptive studies, 5-10 x 10⁶ splenocytes were injected intravenously into the lateral tail vein of 6-week-old NOD.SCID mice. Glycosuria was monitored daily in recipients; mice with two consecutive readings of > 5.5mmol/L confirmed by a blood glucose level > 250mg/dl were considered diabetic. Mice were monitored for 65 days.

Diabetes induction in InsHA mice. Unless specified, at least 8 week-old InsHA mice were injected i.v. with 0.5 to 1.5 10⁶ CD8⁺ T cells (purity >95%) isolated from HA₅₁₂₋₅₂₀-TCR transgenic mice (Miltenyi Biotech). The following day, mice were injected i.v. with 15x10³ DCs. For challenge experiments, 6 x 10⁵ HA₅₁₂₋₅₂₀ loaded LPS-matured DC were injected eleven days after the first immunization. Diabetes was daily monitored using Clinistix urinalysis strips (Bayer) stating five days after the first DC or PBS injection. Mice were

considered diabetic when urine glucose concentration was above 5.5 mmol/L, two times in a row.

***In vivo* proliferation assay**

CD8⁺ Thy1.1⁺ cells from CL4 mice were labelled with Vybrant[®] CFDA-SE (CFSE, carboxy-fluorescein diacetate, succinimidyl ester, Molecular Probes™, Invitrogen). Briefly, spleen cells from CL4 Thy1.1⁺ mice were sorted using mouse CD8 magnetic beads (Miltenyi biotec, Paris, France, >95% pure), washed in PBS and incubated with 5 mM CFSE for 5 min at room temperature. For adoptive studies, 1.5×10^6 CD8⁺ Thy1.1⁺ cells from CL4 mice were injected intravenously into the lateral tail vein of at least 8-week-old InSHA mice.

***In vivo* killing assay.**

Spleens were pulsed with 5 μM of relevant H2-K^d (IYSTVASSL, HA₅₁₂₋₅₂₀) or irrelevant H2-K^d (TYQRTRALV, NP₁₄₇₋₁₅₅) peptide for 1 h at 37°C. Pulsed cells with relevant and irrelevant peptide were incubated 5 min at RT in PBS containing 5 and 0.5 μM CFSE, respectively. Cells were washed in PBS, and 3×10^6 of HA₅₁₂₋₅₂₀-pulsed and 3×10^6 NP₁₄₇₋₁₅₅-pulsed were co-injected i.v. into recipient mice. Mice were killed 16 h later, and spleen cells were analyzed by FACS. Cytolytic activity against HA₅₁₂₋₅₂₀-pulsed target cells was determined by measuring the frequency of CFSE^{high} and CFSE^{low} cells and by calculating the percentage of specific lysis using the following formula: $100 - \left(\frac{\% \text{ HA}_{512-520}\text{-pulsed} / \% \text{ NP}_{147-155}\text{-pulsed in immunized mice}}{\% \text{ HA}_{512-520}\text{-pulsed} / \% \text{ NP}_{147-155}\text{-pulsed in unimmunized mice}} \right) \times 100$.

Evaluation of insulinitis.

By Histology. Pancreata were snap-frozen and cryosections (8-μm thick) were acetone-fixed. Sections (8-μm thick) were stained with H&E (Thermo Electron Corp.), and the degree of insulinitis was evaluated microscopically.

By flow cytometry. Pancreata were removed, immediately transferred into ice-cold PBS and minced with fine scissors in HBSS supplemented with Collagenase P (1mg/ml) and DNase (1mg/ml) both from Sigma. After 30 minutes incubation at 37°C, reaction was stopped with PBS-5mM EDTA, filtered through a 40µM cell stainer and extensively washed with PBS-5mM EDTA. Lymphocytes were isolated at the interface of a 40% and 60% percoll gradient. Cells were washed and stained with anti-CD8 and Thy1.1 antibodies.

Statistical analysis.

Statistical significance between survival curves was assessed using the Log Rank test. In any other case a Mann-Whitney nonparametric t-test was performed. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

FOOTNOTES

* This project was funded by the Agence de la Biomédecine Grant the Fondation Centaure, Fondation Progreffe and ROTRF grant to IA and from the IMBIO network funded by the Région Pays de la Loire through the core facility Research and Development for Clinical Transfer.

Abbreviations used in this paper: DC, dendritic cells; iDC, immature DC; HO-1, heme oxygenase-1; CO, carbon monoxide; HA, influenza virus hemagglutinin; CORM2, tricarbonyldichlororuthenium (II) dimmer; iCORM, inactive form of CORM2.

References

Amrani, A., Verdaguer, J., Serra, P., Tafuro, S., Tan, R., and Santamaria, P. (2000). Progression of autoimmune diabetes driven by avidity maturation of a T-cell population. *Nature* 406, 739-742.

Apostolou, I., and von Boehmer, H. (2004). In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med* 199, 1401-1408.

Bach F, Hancock W, and Ferran C (1997). Protective genes expressed in endothelial cells: a regulatory response to injury. *Immunology Today* 18, 483-486.

Bedoui, S., Whitney, P. G., Waithman, J., Eidsmo, L., Wakim, L., Caminschi, I., Allan, R. S., Wojtasiak, M., Shortman, K., Carbone, F. R., *et al.* (2009). Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nat Immunol* 10, 488-495.

Biburger, M., Theiner, G., Schadle, M., Schuler, G., and Tiegs, G. (2009). Pivotal Advance: Heme oxygenase 1 expression by human CD4+ T cells is not sufficient for their development of immunoregulatory capacity. *J Leukoc Biol*.

Blancou, P., and Aneon, I. (2010). Editorial: Heme oxygenase-1 and dendritic cells: what else? *J Leukoc Biol* 87, 185-187.

Blancou, P., Mallone, R., Martinuzzi, E., Severe, S., Pogu, S., Novelli, G., Bruno, G., Charbonnel, B., Dolz, M., Chaillous, L., *et al.* (2007). Immunization of HLA class I transgenic mice identifies autoantigenic epitopes eliciting dominant responses in type 1 diabetes patients. *J Immunol* 178, 7458-7466.

Blancou, P., Tardiff, V., Simon, T., Rémy, S., Carreño, L., Kalergis, A., and Aneon, I. (2010). Immunoregulatory properties of heme oxygenase-1. *Methods in Mol Biol* "Suppressive and regulatory mechanisms in immune responses ", Humana Press *in press*.

Braudeau, C., Bouchet, D., Tesson, L., Iyer, S., Remy, S., Buelow, R., Aneon, I., and Chauveau, C. (2004). Induction of long-term cardiac allograft survival by heme oxygenase-1 gene transfer. *Gene Ther* 11, 701-710.

Brocke, S., Gijbels, K., Allegretta, M., Ferber, I., Piercy, C., Blankenstein, T., Martin, R., Utz, U., Karin, N., Mitchell, D., *et al.* (1996). Treatment of experimental encephalomyelitis with a peptide analogue of myelin basic protein. *Nature* 379, 343-346.

Chauveau, C., Bouchet, D., Roussel, J., Mathieu, P., Braudeau, C., Renaudin, K., Tesson, L., Soullillou, J., Iyer, S., Buelow, R., and Aneon, I. (2002). Gene transfer of heme oxygenase-1 and carbon monoxide delivery inhibit chronic rejection. *Am J Transplant* 2, 581-592.

Chauveau, C., Remy, S., Royer, P., Hill, M., Tanguy-Royer, S., Hubert, F. X., Tesson, L., Brion, R., Beriou, G., Gregoire, M., *et al.* (2005). Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and pro-inflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood* 106, 1694-1702.

Chora, A. A., Fontoura, P., Cunha, A., Pais, T. F., Cardoso, S., Ho, P. P., Lee, L. Y., Sobel, R. A., Steinman, L., and Soares, M. P. (2007). Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress autoimmune neuroinflammation. *J Clin Invest* 117, 438-447.

Creusot, R.J., Shariar S.Y., Pearl C., Chia J., Contag C.H., Sanjiv S.G. and Fathman G.C. (2009). Lymphoid tissue-specific homing of bone marrow-derived dendritic cells. *Blood*. 113, 6638-6647.

George, J. F., Braun, A., Brusko, T. M., Joseph, R., Bolisetty, S., Wasserfall, C. H., Atkinson, M. A., Agarwal, A., and Kapturczak, M. H. (2008). Suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells is dependent on expression of heme oxygenase-1 in antigen-presenting cells. *Am J Pathol* 173, 154-160.

Graser, R. T., DiLorenzo, T. P., Wang, F., Christianson, G. J., Chapman, H. D., Roopenian, D. C., Nathenson, S. G., and Serreze, D. V. (2000). Identification of a CD8 T cell that can independently mediate autoimmune diabetes development in the complete absence of CD4 T cell helper functions. *J Immunol* 164, 3913-3918.

Hancock, W. W., Buelow, R., Sayegh, M. H., and Turka, L. A. (1998). Antibody-induced transplant arteriosclerosis is prevented by graft expression of anti-oxidant and anti-apoptotic genes. *Nat Med* 4, 1392-1396.

Herold, K. C., Gitelman, S. E., Masharani, U., Hagopian, W., Bisikirska, B., Donaldson, D., Rother, K., Diamond, B., Harlan, D. M., and Bluestone, J. A. (2005). A single course of anti-CD3 monoclonal antibody hOKT3gamma1(Ala-Ala) results in improvement in C-peptide responses and clinical parameters for at least 2 years after onset of type 1 diabetes. *Diabetes* 54, 1763-1769.

Hu, C. M., Lin, H. H., Chiang, M. T., Chang, P. F., and Chau, L. Y. (2007). Systemic expression of heme oxygenase-1 ameliorates type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes* 56, 1240-1247.

Kadri, N., Potiron, N., Ouary, M., Jegou, D., Gouin, E., Bach, J. M., and Lieubeau, B. (2007). Fetal calf serum-primed dendritic cells induce a strong anti-fetal calf serum immune response and diabetes protection in the non-obese diabetic mouse. *Immunol Lett* 108, 129-136.

Kirino, M., Kirino, Y., Takeno, M., Nagashima, Y., Takahashi, K., Kobayashi, M., Murakami, S., Hirasawa, T., Ueda, A., Aihara, M., *et al.* (2008). Heme oxygenase 1 attenuates the development of atopic dermatitis-like lesions in mice: implications for human disease. *J Allergy Clin Immunol* 122, 290-297, 297 e291-298.

Li, M., Peterson, S., Husney, D., Inaba, M., Guo, K., Kappas, A., Ikehara, S., and Abraham, N. G. (2007a). Long-lasting expression of HO-1 delays progression of type I diabetes in NOD mice. *Cell Cycle* 6, 567-571.

Li, M., Peterson, S., Husney, D., Inaba, M., Guo, K., Terada, E., Morita, T., Patil, K., Kappas, A., Ikehara, S., and Abraham, N. G. (2007b). Interdiction of the diabetic state in NOD mice by sustained induction of heme oxygenase: possible role of carbon monoxide and bilirubin. *Antioxid Redox Signal* 9, 855-863.

Listopad, J., Asadullah, K., Sievers, C., Ritter, T., Meisel, C., Sabat, R., and Docke, W. D. (2007). Heme oxygenase-1 inhibits T cell-dependent skin inflammation and differentiation and function of antigen-presenting cells. *Exp Dermatol* 16, 661-670.

Lo, D., Freedman, J., Hesse, S., Palmiter, R. D., Brinster, R. L., and Sherman, L. A. (1992). Peripheral tolerance to an islet cell-specific hemagglutinin transgene affects both CD4+ and CD8+ T cells. *Eur J Immunol* 22, 1013-1022.

Luo, X., Herold, K. C., and Miller, S. D. (2010). Immunotherapy of type 1 diabetes: where are we and where should we be going? *Immunity* 32, 488-499.

Morelli, A. E., and Thomson, A. W. (2007). Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol* 7, 610-621.

Morgan, D. J., Liblau, R., Scott, B., Fleck, S., McDevitt, H. O., Sarvetnick, N., Lo, D., and Sherman, L. A. (1996). CD8(+) T cell-mediated spontaneous diabetes in neonatal mice. *J Immunol* 157, 978-983.

Nakayama, M., Abiru, N., Moriyama, H., Babaya, N., Liu, E., Miao, D., Yu, L., Wegmann, D. R., Hutton, J. C., Elliott, J. F., and Eisenbarth, G. S. (2005). Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Nature* 435, 220-223.

Noble, A., Giorgini, A., and Leggat, J. A. (2006). Cytokine-induced IL-10-secreting CD8 T cells represent a phenotypically distinct suppressor T-cell lineage. *Blood* 107, 4475-4483.

Piaggio, E., Mars, L. T., Cassan, C., Cabarrocas, J., Hofstatter, M., Desbois, S., Bergereau, E., Rotzschke, O., Falk, K., and Liblau, R. S. (2007). Multimerized T cell epitopes protect from experimental autoimmune diabetes by inducing dominant tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 9393-9398.

Poss Kd, and Tonegawa S (1997). Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *PNAS* 94, 10925-10930.

Raz, I., Elias, D., Avron, A., Tamir, M., Metzger, M., and Cohen, I. R. (2001). Beta-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial. *Lancet* 358, 1749-1753.

Remy, S., Blancou, P., Tesson, L., Tardif, V., Brion, R., Royer, P. J., Motterlini, R., Foresti, R., Painchaut, M., Pogu, S., *et al.* (2009). Carbon monoxide inhibits TLR-induced dendritic cell immunogenicity. *J Immunol* 182, 1877-1884.

Sela, M. (1999). The concept of specific immune treatment against autoimmune diseases. *Int Rev Immunol* 18, 201-216.

Soares, M. P., Lin, Y., Anrather, J., Csizmadia, E., Takigami, K., Sato, K., Grey, S. T., Colvin, R. B., Choi, A. M., Poss, K. D., and Bach, F. H. (1998). Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. *Nat Med* 4, 1073-1077.

Steinman, R. M., Hawiger, D., and Nussenzweig, M. C. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21, 685-711.

Trudeau, J. D., Kelly-Smith, C., Verchere, C. B., Elliott, J. F., Dutz, J. P., Finegood, D. T., Santamaria, P., and Tan, R. (2003). Prediction of spontaneous autoimmune diabetes in NOD mice by quantification of autoreactive T cells in peripheral blood. *J Clin Invest* 111, 217-223.

Vizler, C., Bercovici, N., Heurtier, A., Pardigon, N., Goude, K., Bailly, K., Combadiere, C., and Liblau, R. S. (2000). Relative diabetogenic properties of islet-specific Tc1 and Tc2 cells in immunocompetent hosts. *J Immunol* 165, 6314-6321.

Wicker, L. S., Leiter, E. H., Todd, J. A., Renjilian, R. J., Peterson, E., Fischer, P. A., Podolin, P. L., Zijlstra, M., Jaenisch, R., and Peterson, L. B. (1994). Beta 2-microglobulin-deficient NOD mice do not develop insulinitis or diabetes. *Diabetes* 43, 500-504.

Wong, F. S., Visintin, I., Wen, L., Flavell, R. A., and Janeway, C. A., Jr. (1996). CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells. *J Exp Med* 183, 67-76.

Xia, Z. W., Zhong, W. W., Xu, L. Q., Sun, J. L., Shen, Q. X., Wang, J. G., Shao, J., Li, Y. Z., and Yu, S. C. (2006). Heme oxygenase-1-mediated CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells suppress allergic airway inflammation. *J Immunol* 177, 5936-5945.

Yachie, A., Niida, Y., Wada, T., Igarashi, N., Kaneda, H., Toma, T., Ohta, K., Kasahara, Y., and Koizumi, S. (1999). Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest* 103, 129-135.

Ye, Z., Xu, S., Moyana, T., Yang, J., and Xiang, J. (2008). Defect of CD8⁺ memory T cells developed in absence of IL-12 priming for secondary expansion. *Cell Mol Immunol* 5, 147-152.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Administration of COg-treated DC lowers diabetes incidence in NOD colony.

(A) Bone marrow from NOD mice were culture in 2% NOD mouse serum with recombinant mouse GM-CSF. CD11c⁺ cells were sorted after six days of culture, treated or not with CO as gas (300-450ppm for 2 hours), matured with LPS and loaded with insulin B₁₅₋₂₃ peptide (LPS/CO/InsB₁₅₋₂₃ and LPS/InsB₁₅₋₂₃ resp.). PBS or 2.5×10^5 CD11c⁺ cells were administered to female NOD mice at 4-5 weeks of age. These mice were followed for diabetes development. Data were pooled from three independent experiments (n = number of mice). Incidence curves for each group are shown. **(B)** The extent of insulinitis was determined eight month after immunization as the percentage of normal, periinfiltrated, infiltrated <50%, or infiltrated >50% islets (n = 3 mice/group) **(C)** Splenocytes from LPS/CO/InsB₁₅₋₂₃ and LPS/InsB₁₅₋₂₃ mice were transferred to NOD-SCID mice. These mice were followed for two month for diabetes development. Data were pooled from two independent experiments (n= number of mice). (A and B) Mice were considered diabetic when they were at least positive for glycosuria two times in a row and confirmed by glycemia at the time of sacrifice. p value of a Log Rank test is reported in the legend.

Figure 2: COg-treated DC inhibit immunogenicity in a peptide-dependant manner but CD4⁺CD25⁺ and IL-10-independent manner.

(A, B, C and D) All mice were transferred with 0.5 to 1.5×10^6 anti-HA₅₁₂₋₅₂₀ TCR transgenic CD8⁺ T cells. The following day, mice were immunized with 3 to 1.5×10^4 of HA₅₁₂₋₅₂₀ loaded mature DC treated (“LPS/HA/CO” or “LPS/NP/CO” group) or not (“LPS/HA” group) with CO as gas (300-450 ppm for 2 hours). Mice were followed for diabetes development by glycosuria. **(A)** DC were either treated with or without 300-450 ppm of CO as gas for two hours. **(B)** CO-treated DC were either loaded with H2K^d irrelevant NP₁₄₇₋₁₅₅ or relevant HA₅₁₂₋₅₂₀ peptide and intravenously injected to recipients. **(C)** Recipient mice were CD4⁺ Treg-depleted by three injections (at days -8, -5

and -2) of anti-CD25 mAb (PC61 clone) before assessing their resistance to diabetes. Rat IgG2a was used as isotype control (IC) and administered with the same dose and schedule that PC61mAb injection. **(D)** IL-10 knock out (IL-10^{KO}) or IL-10 wild type (IL-10^{wt}) DC were used to immunized recipient mice. A, B, C and D are a pool of at least two independent experiments (n = number of mice).

Figure 3: COg-treated DCs induce normal *in vitro* CD8+ T cells priming and function.

(A, B C) CD8⁺ sorted cells from spleen and lymph nodes of anti-HA₅₁₂₋₅₂₀ TCR HA transgenic mice were incubated with DCs loaded with HA₅₁₂₋₅₂₀ peptide (5 μM for A and C, 50nM for B) at various DC vs. CD8 ratios. DC were treated (black columns) or not (white columns) with CO as gas (300-450 ppm for 2 hours) and LPS. Results are from one of three similar experiments. **(A)** [³H] thymidine incorporation was measured after 72 h of stimulation of CD8⁺ T cells by untreated or COg-treated DC. **(B)** IL-2 secretion was measured by ELISA 18 h after coculture. **(C)** CD25 and **(D)** CD69 early activation markers expression on CD8⁺ cells was evaluated 18h after coculture.

Figure 4: COg-treated DCs have conserved *in vivo* CD8+ T cells priming capacity.

(A, B, C and D) All mice were transferred with 1.5 x 10⁶ CFSE-loaded Thy1.1⁺ anti-HA₅₁₂₋₅₂₀ TCR transgenic CD8⁺ T cells. The following day, mice were immunized with 1.5 to 3 x 10⁴ of HA₅₁₂₋₅₂₀ loaded mature DC treated (“LPS/HA/CO” group) or not (“LPS/HA” group) with CO as gas (300-450 ppm for 2 hours). Animals were sacrificed ten days post-immunization. Lymphocytes from spleen, pancreatic lymph nodes (PLN) and non pancreatic lymph nodes (nPLN) were isolated and stained with anti-CD8 and Thy1.1 antibodies. CD44 activation marker on donor cells (CD8⁺ Thy1.1⁺) was assessed as percentage in different organs. A representative FACS analysis is presented **(A)** together with a quantitative analysis of three independent experiments **(B)**. (C, D) Proliferation of donor cells was evaluated as percentage **(C)** or as number **(D)** of donor cells by FACS analysis gating on CD8⁺ Thy1.1⁺

cells in different organs. *B* and *C* are a pool of three independent experiments. All statistical analysis between LPS/HA/CO and LPS/HA group are not significant ($p > 0.1$, unpaired t-test).

Figure 5: Peripheral function of autoreactive CD8+ T cells primed by CO-treated DC is preserved. (*A*, and *B*) All mice were treated as in Figure 4. **(A)** On day 10, the proportion of IFN- γ ⁺ donor cells was determined in splenocytes and PLN by intracellular cytokine staining assay. A representative picture of the FACS analysis is shown (*left*) and a quantification of IFN- γ secreting donor cells in spleen and in PLN is reported (*right*). Positive (respectively negative) control was obtained using with PMA/ionomycine as unspecific T cells activator (resp. H2K^d NP₁₄₇₋₁₅₅ peptide). **(B)** On day 10, syngeneic CFSE-labeled splenocytes were either loaded with HA₅₁₂₋₅₂₀ (CFSE high) or irrelevant NP₁₄₇₋₁₅₅ (CFSE low) peptide and intravenously administered to mice. The percentage of specific lysis was determined by FACS 12 hours after transfer. A representative picture of lysis observed by FACS is shown (*left*) and a quantitation of CTL lysis activity is reported (*right*). One representative experiment out of three is presented. None of the results are significantly different when LPS/HA and LPS/HA/CO are compared ($p > 0.1$, unpaired t-test).

Figure 6: COg-treated DC tolerize autoreactive CD8+ T cells. (*A*, *B* and *C*) All mice received 0.5 to 1.5×10^6 naïve anti-HA₅₁₂₋₅₂₀ TCR transgenic CD8+ T cells at day -1 . The following days, they were injected with either PBS, 1.5×10^4 LPS-matured DC loaded with HA₅₁₂₋₅₂₀ treated (“LPS/HA/CO” group) or not (“LPS/HA” group) with CO. All untreated DC immunized mice developed diabetes within ten days whereas COg-treated DC immunized mice remains free of diabetes as in Figure 2A. Diabetes-free mice were subsequently challenged at day 11 with 6×10^4 immunogenic HA₅₁₂₋₅₂₀-loaded mDC **(A)** or 12.5 HA units of influenza virus **(B)** or islet-specific cytotoxic T cells (Tc1) **(C)**. Mice were considered diabetic

when they were at least positive for glycosuria two times in a row. Data were pooled from three (A) or two (B, C) independent experiments (n = number of mice).

Figure 7: Autoreactive CD8+ T cells are impaired in their migratory function when stimulated with CO-treated DC. (A and B) All mice were treated as in Figure 4. The extent of insulinitis was determined at 14 days either by histological (A) or FACS (B) analysis in two different experiments for each technique. (A) The extent of insulinitis was determined as the percentage of normal, periinfiltrated, infiltrated <50%, or infiltrated >50% islets (n = 6 mice/group) after hematoxylin Eosin coloration. Total number of islets for each group is indicated in parentheses. (B) The extent of insulinitis was determined as the number of donor cells (CD8⁺Thy1.1⁺) after isolation of infiltrating lymphocytes in pancreas.

Figure S1: IL-12 and IL-10 production by COg-treated DC. (A and B) DC (bmDC) were derived from Babl/c bone marrow after six days culture with recombinant mouse GM-CSF (see Material and Method), sorted for CD11c marker and treated or not with CO (300-450 ppm for 2h). 24-hours post culture, supernatant was collected for IL-12 (A) and IL-10 (B) detection by ELISA and viability was evaluated (>90%, data not shown).

Figure S2: CD4⁺CD25⁺ T cell depletion by anti-CD25 antibody. (A and B) Anti-CD25 monoclonal antibody (PC61) and isotype control (rat IgG1) was administered at day -7, -3 and 0 before transfer of 1.5×10^6 naïve anti-HA₅₁₂₋₅₂₀ TCR transgenic CD8⁺ T cells. The following days, these two groups were injected with either 1.5×10^4 LPS-matured DC loaded with HA₅₁₂₋₅₂₀ and treated or not with CO (incidence results Figure 2C). One animal in each group (Isotype control, A; anti-CD25, B) was sacrificed at day 4 and mesenteric lymph nodes were removed and stained for CD4, CD8 and CD25 surface markers.

Figure 1

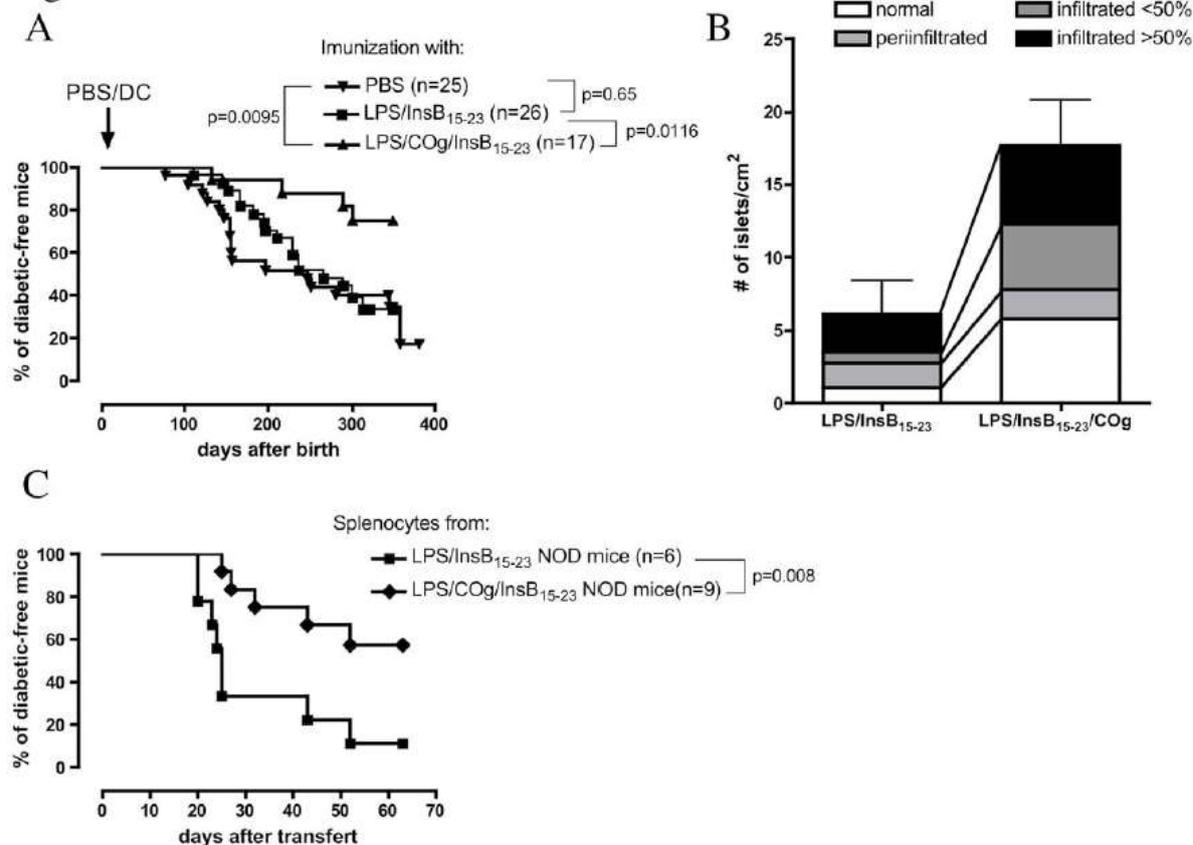


Figure 2

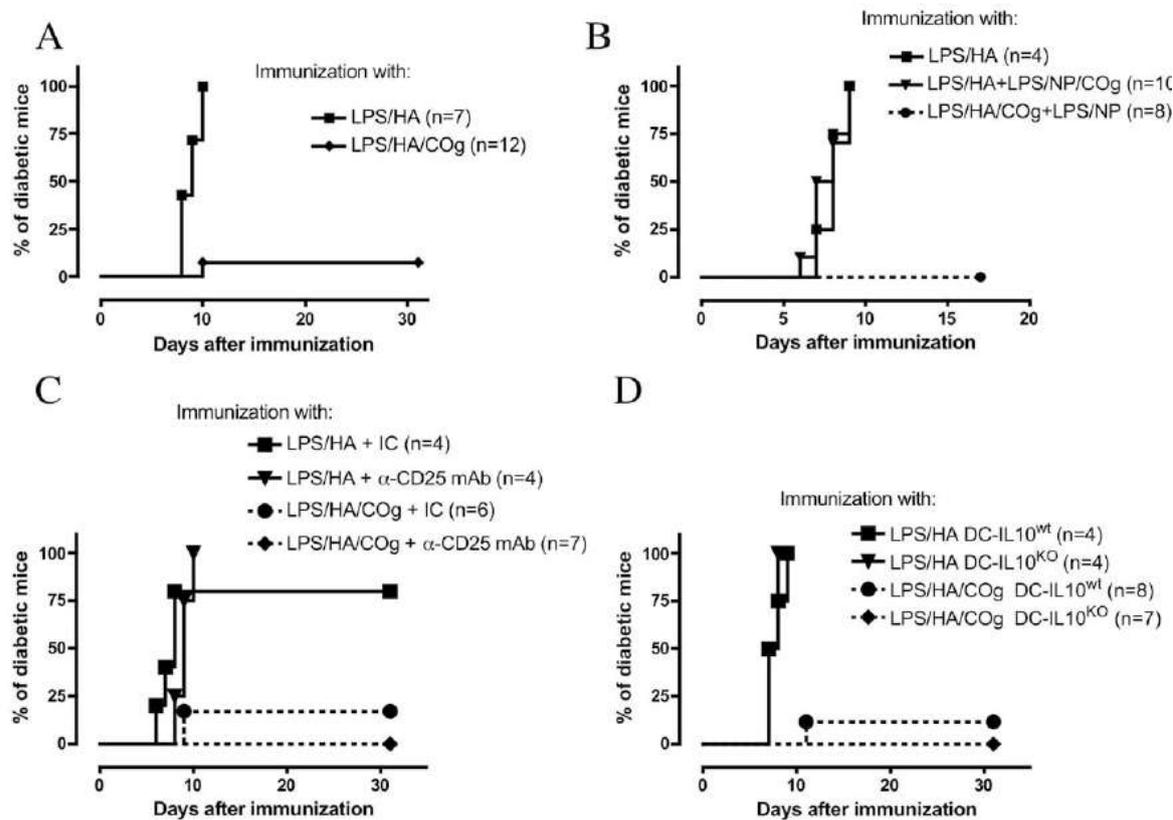


Figure 3

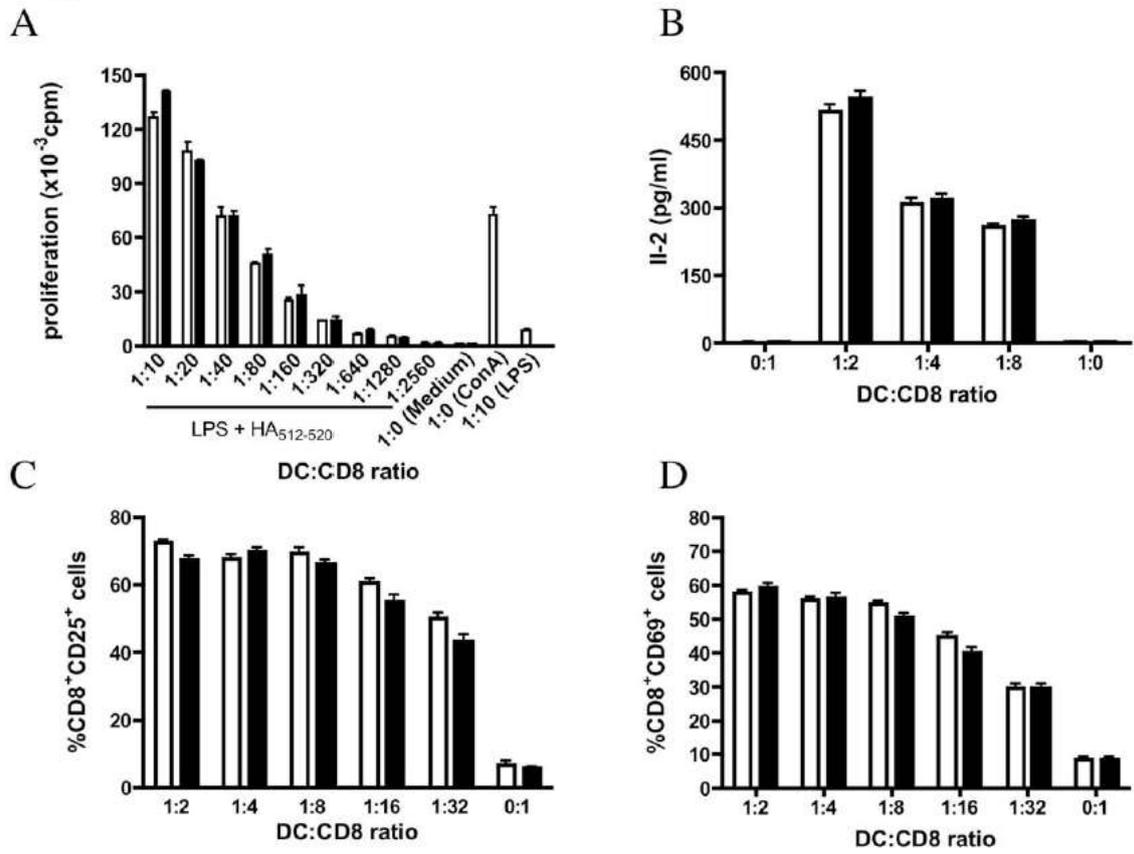


Figure 4

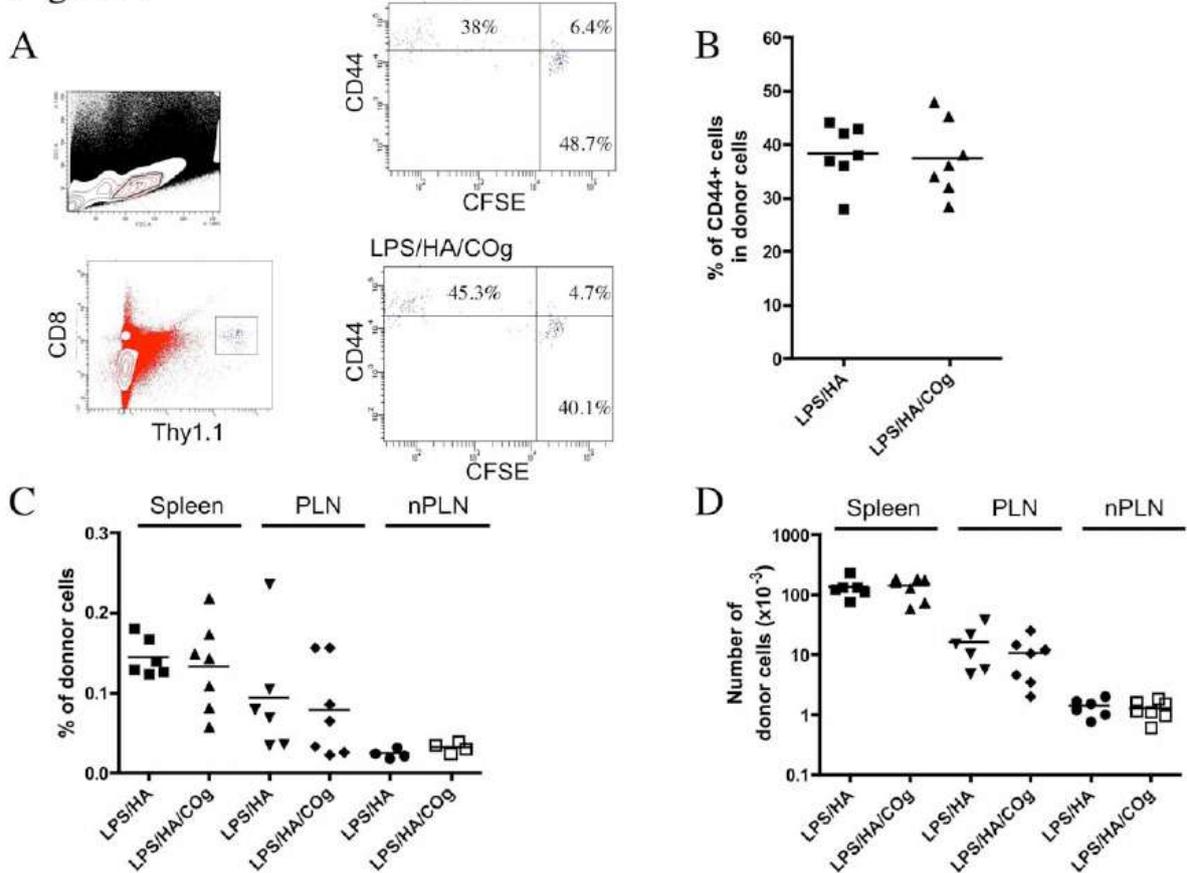


Figure 5

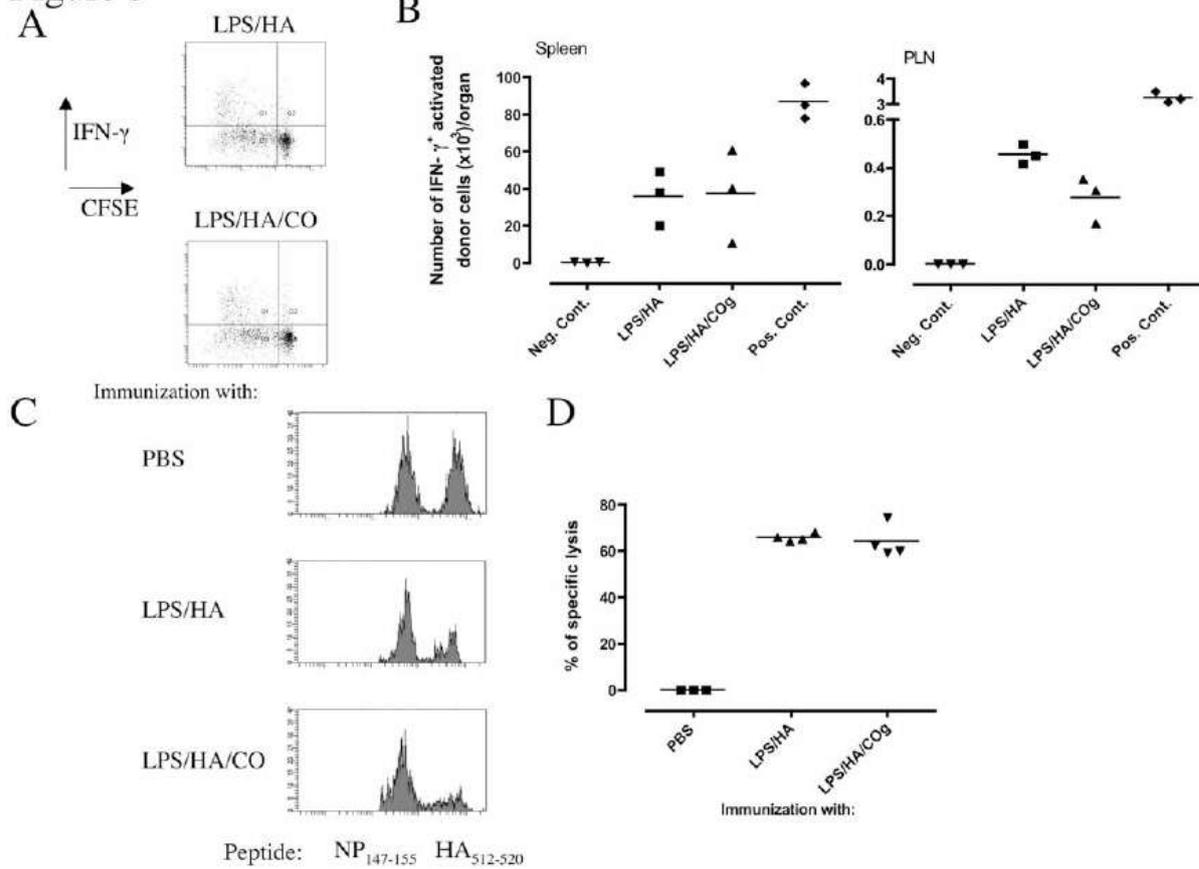


Figure 6

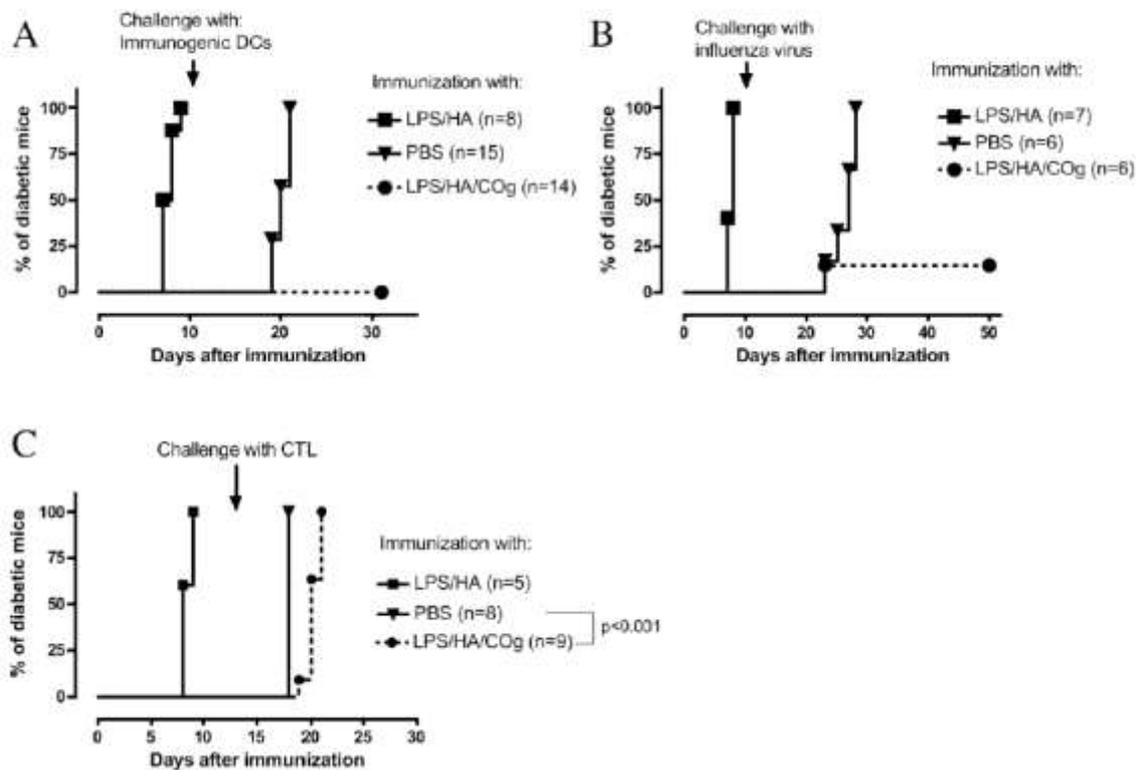
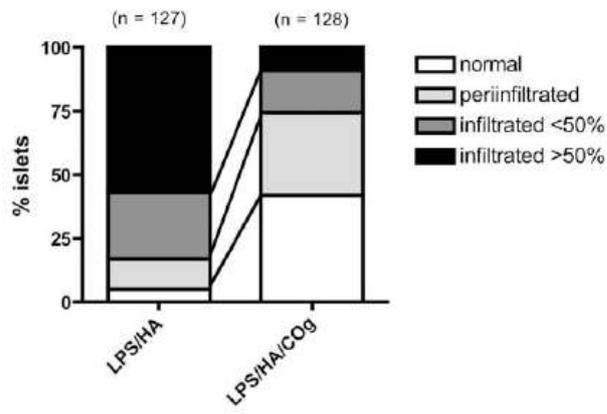
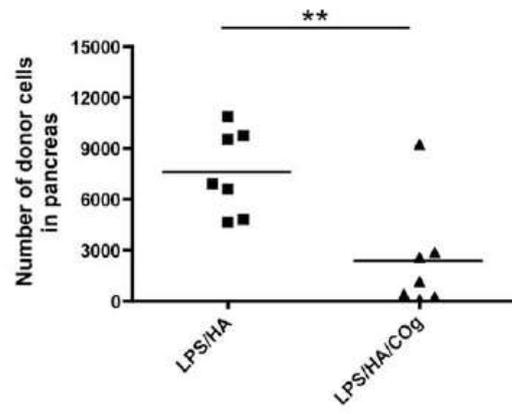


Figure 7

A

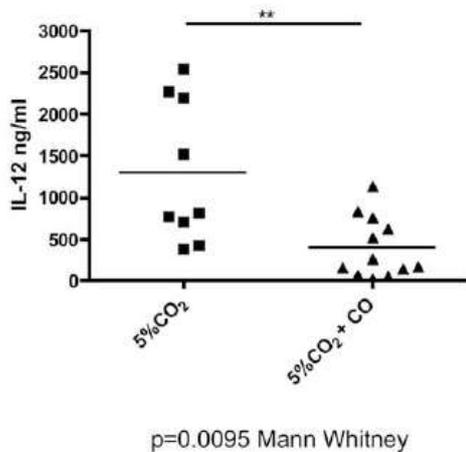


B

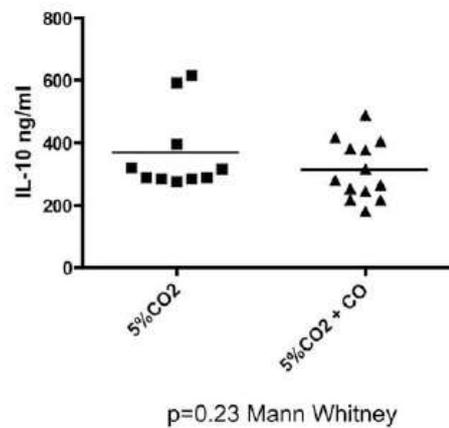


S1

A

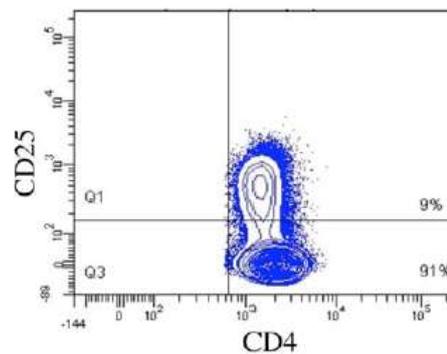
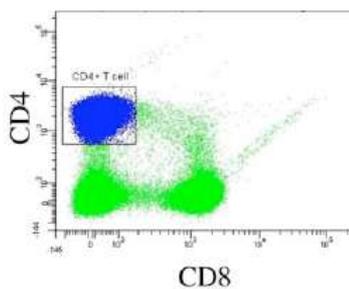
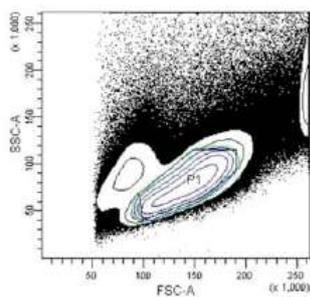


B

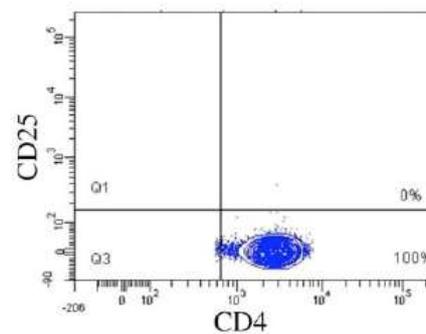
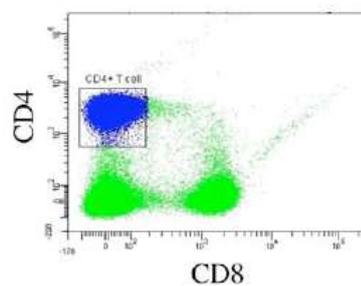
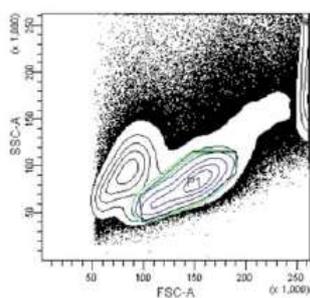


S2

Isotype control (rat IgG1)



Anti-CD25 mAb (PC61)



D. Résultats complémentaires

→ La piste de la production de CCL3 par les cellules T Thy1.1+ CD8+ autoréactives

Pour expliquer la différence d'insulite observée dans les souris immunisées avec des DC traitées CO, nous avons étudié la piste de la production du CCL3 (MIP1 α) par nos cellules T Thy1.1+ CD8+ autoréactives. En effet, dans un modèle d'infection bactérienne chez la souris, il a été montré que lors de la réactivation de cellules T CD8+ mémoires à la suite d'une seconde infection bactérienne, ces cellules T CD8+ mémoires produisent du CCL3, qui permet l'activation des cellules mononucléaires phagocytaires inflammatoires *via* la sécrétion de TNF α et l'élimination de la bactérie par la production de réactifs oxygénés par ces cellules innées (Narni-Mancinelli et al., 2007). Bien que ce mécanisme semble assez loin de notre modèle, une telle production de CCL3 par les cellules T Thy1.1+ CD8+ autoréactives pourrait expliquer les différences d'inflammation relevées au niveau du pancréas entre les souris immunisées par les DC-CO et les autres, puisque le CCL3 attire préférentiellement les macrophages et/ou monocytes (Cameron et al., 2000). De plus, les souris NOD.MIP1 α (CCL3) $-/-$ présentent une amélioration de l'insulite et une protection contre le diabète (Cameron et al., 2000).

La Figure 26 représente le résultat de l'analyse par cytométrie en flux obtenu pour les splénocytes issus de 8 souris (4 souris immunisées LPS-HA et 4 souris immunisées LPS-HA-CO). Aucune différence dans la production du CCL3 par les cellules T Thy1.1+ CD8+ autoréactives n'est observée entre les 2 groupes de souris.

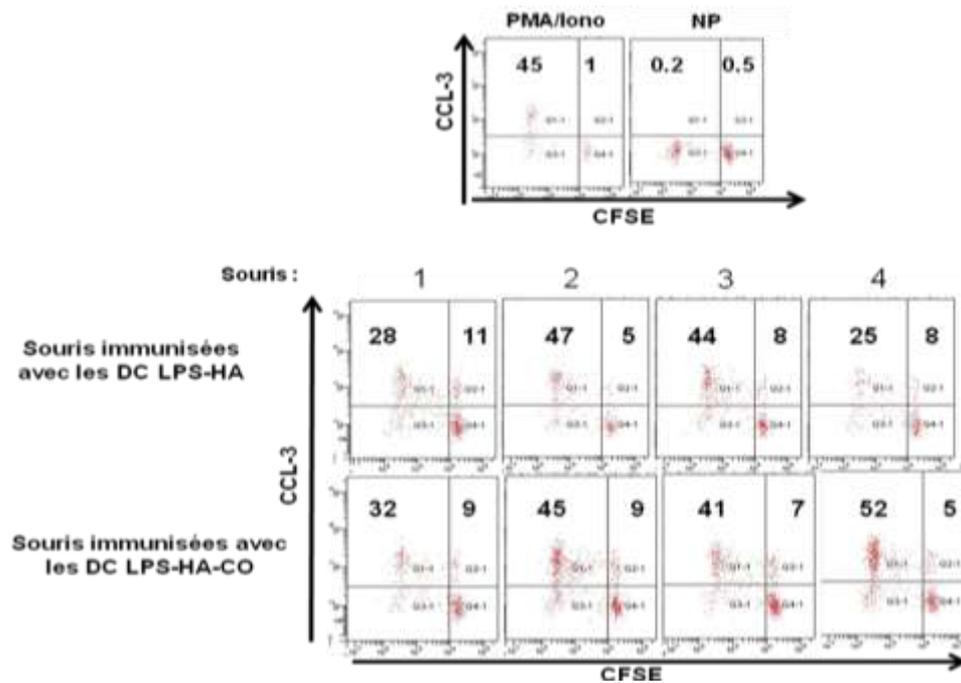


Figure 26. Production de CCL3 par les cellules CD8+ Thy1.1+ autoréactives.

Les souris ins-HA sont injectées avec les cellules CD8+ Thy1.1+ autoréactives, marquées au CFSE. Le jour suivant, les souris sont immunisées avec des DC traitées CO ou non, chargées le peptide HA₅₁₂₋₅₂₀ ou NP₁₄₇₋₁₅₅ et maturées au LPS. A J10 après l'immunisation, les cellules CD8+ Thy1.1+ autoréactives sont récupérées à partir de la rate et marquées anti-CD8, anti-Thy1.1 et anti-CCL3. Les graphiques représentent l'expression du CCL3 par les cellules Thy1.1+ CD8+. Un contrôle positif est représenté par l'activation des splénocytes par la PMA-Ionomycine, les splénocytes d'une souris NP servent de contrôle négatif.

→ Etude de l'expression des récepteurs d'adressage impliqués dans la pathogénèse du diabète auto-immun de type 1

Plusieurs récepteurs d'adressage ont été impliqués dans la pathogénèse du diabète chez la souris NOD, notamment les intégrines hétérodimériques $\alpha 4 \beta 7$ (LPAM-1) et $\alpha 4 \beta 1$ (VLA-4). L'équipe de Kurts a notamment montré, en utilisant les modèles de souris transgéniques exprimant l'autoantigène ovalbumine aux niveaux des îlots pancréatiques (RIP-OVA) que ces récepteurs sont différenciellement exprimés par les cellules T CD4+ et T CD8+ suivant le lieu d'activation de celles-ci (Hänninen et al., 2007). En effet, après injection de l'ovalbumine dans les muqueuses gastriques, les cellules T expriment l'intégrine $\alpha 4 \beta 7$, alors que les cellules T activées par les auto-antigènes des îlots pancréatiques dans les ganglions pancréatiques expriment la forme active de l'intégrine $\alpha 4 \beta 1$. Nous avons donc testé dans notre modèle de diabète auto-immun, par cytométrie en flux, l'expression des intégrines $\alpha 4$, $\beta 1$ (sa forme activée et non activée) et $\alpha 4 \beta 7$. Nous n'avons obtenu aucune différence significative d'expression de ces marqueurs par les cellules T Thy1.1+ CD8+

autoréactives 10 à 12 jours après l'immunisation, qu'elles soient activées par des DCs traitées au CO ou pas.

D'autres récepteurs ont été testés, comme le CCR5 (CD195), connu pour permettre la migration des lymphocytes CD8+ vers les tissus inflammés et dont le ligand est le CCL3 (précédemment étudié) ou le CCR7, permettent l'adressage des cellules T CD8+ vers les ganglions lymphatiques. Là encore, aucune différence significative d'expression de ces marqueurs sur les cellules T CD8+ Thy1.1+ n'a été observée 10 à 12 jours après l'immunisation.

Un autre récepteur associé à l'adressage vers les lésions insulitiques, chez l'homme et la souris, est le CXCR3 (van Halteren et al., 2005). Nous avons trouvé une faible diminution (de l'ordre de 15%) d'expression de ce récepteur par les cellules T CD8+ Thy1.1+ CD8+ autoréactives activées par les DCs traitées au CO, en comparaison avec celles activées par les DCs non traitées au CO (Figure 27-A). De façon intéressante, on constate également que l'induction de l'expression du CXCR3, entre les cellules T Thy1.1+ CD8+ donneuses naïves et activées, est plus élevée pour le groupe de souris immunisées par les DCs LPS-HA₅₁₂₋₅₂₀. (Figure 27-B). Ces différences étant très faibles et le résultat très préliminaire, d'avantages d'expérimentations sont nécessaires pour confirmer ou infirmer ce résultat.

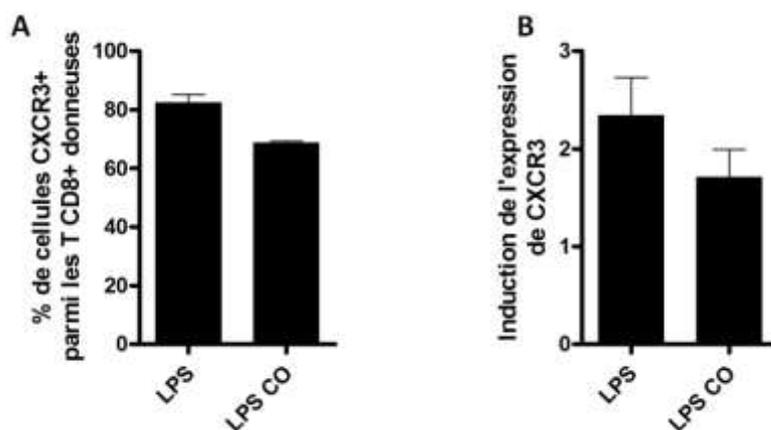


Figure 27. Expression du CXCR3 sur les cellules T CD8+ Thy1.1 à 12 jours après immunisation.

Les souris ins-HA sont injectées avec les cellules CD8+ Thy1.1+ autoréactives (cellules donneuses), marquées au CFSE. Le jour suivant, les souris sont immunisées avec des DC traitées CO ou non, chargées avec le peptide HA₅₁₂₋₅₂₀ et maturées au LPS. A J12 après l'immunisation, les cellules CD8+ Thy1.1+ autoréactives sont récupérées à partir de la rate et marquées anti-CD8, anti-Thy1.1 et anti-CXCR3. **(A)** L'histogramme représente le % de cellules T CD8+ Thy1.1+ CXCR3+ parmi les cellules donneuses divisées. **(B)** L'histogramme représente l'induction de l'expression du CXCR3 sur les cellules T CD8+ Thy1.1+ CXCR3+ entre les cellules naïves et activées. Ces résultats sont représentatifs d'une expérience regroupant les valeurs obtenues pour 3 souris dans le groupe LPS-HA comparées à 3 souris dans le groupe LPS-HA-CO.

II-Etude de l'impact d'HO-1 et du CO dans le mécanisme de cross-présentation des DCs.

Nous venons de voir qu'*in vivo*, les DCs traitées au CO ont un rôle sur la pathogénicité des cellules T CD8+ autoréactives par présentation directe du peptide antigénique. Une deuxième partie de mon travail a consisté à analyser si HO-1 ou le CO pouvait avoir un impact sur le mécanisme de cross-présentation des DCs.

A. Phénotype des BMDCs de souris

Pour cette étude, nous avons utilisé des DCs de souris dérivées de la moelle osseuse. Après 6 jours de différenciation en présence de 10ng/ml de GM-CSF, les cellules sont récoltées et triées pour l'expression du marqueur CD11c+ sur colonne LS (Mytenyi Biotec). Les DCs CD11c+ sont ensuite traitées au CoPP ou au CORM puis maturées au LPS. Contrairement aux DCs humaines dérivées de la moelle et aux BMDCs de rat (Chauveau et al., 2005; Remy et al., 2009), l'induction de l'expression d'HO-1 ou le traitement au CO par le CORM ne modifie pas significativement l'expression des marqueurs phénotypiques de maturation induits par le LPS, tels que le CD86, le CD80, le CD40 et le CMH de classe II (Figure 28). Une légère diminution de l'expression est tout de même observée avec le traitement au CoPP, en particulier pour le marqueur CD86 et CD80 (Figure 28-B).

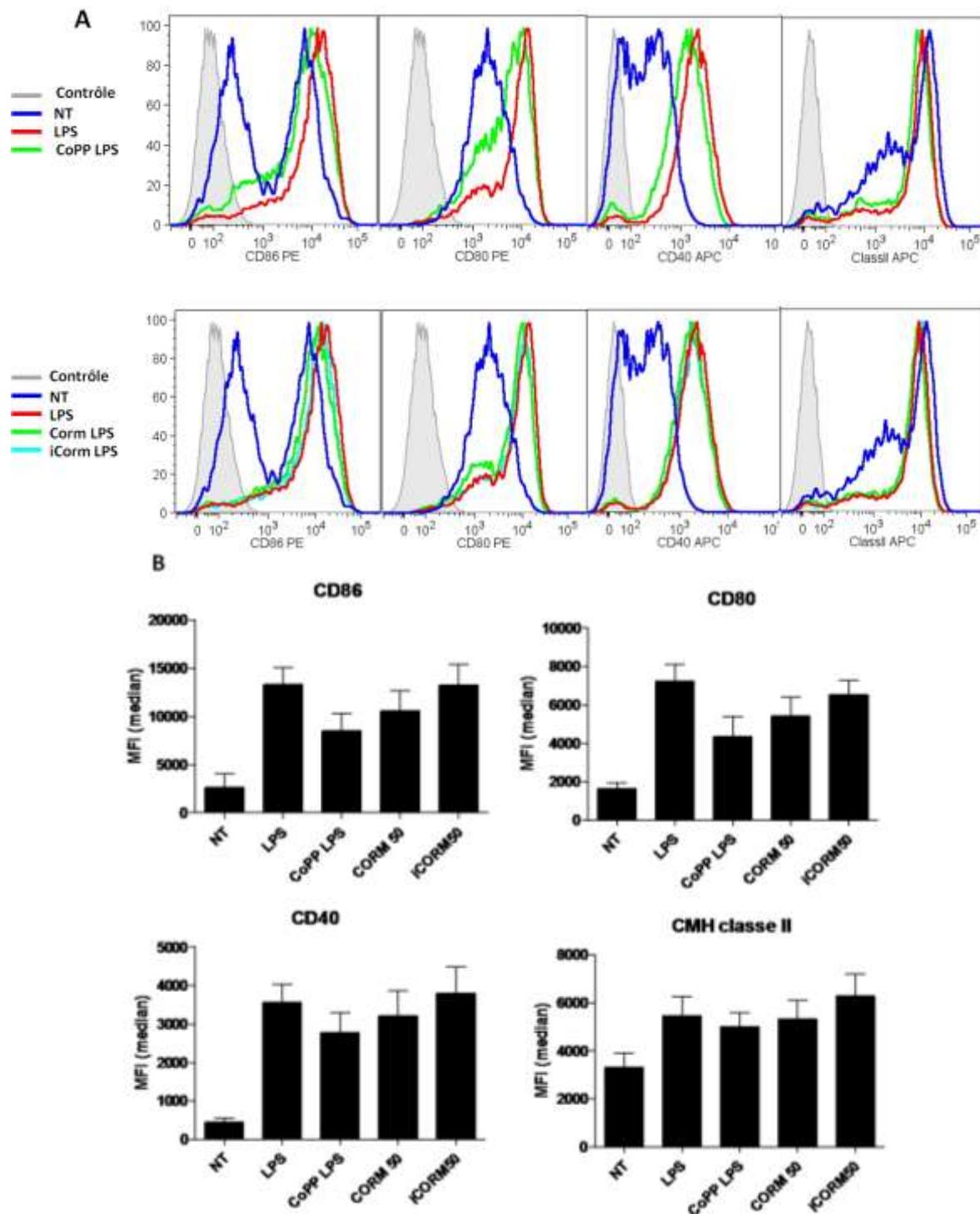


Figure 28. Phénotype des BMDCs de souris

(A) Analyse, par cytométrie en flux, de l'expression du CD86, CD80, CD40 et du CMH-II, par les BMDC de souris traitées ou non avec 50µM CoPP (2h de traitement), 50µM CORM ou 50µM l'iCORM (contrôle du traitement CORM) (1h de traitement) puis stimulées au LPS (0,5µg/ml) pendant 20h. Représentative d'une expérience. (B) Histogramme des médianes de fluorescence obtenues pour l'expression du CD86, CD80, CD40 et du CMH-II dans 4 à 7 expériences indépendantes. Les analyses statistiques ont été réalisées avec un t-test non paramétrique, Mann-Whitney, $p > 0.05\%$.

B. Sécrétion des cytokines

La production, par les BMDCs, de la cytokine pro-inflammatoire IL-12p70 induite par le LPS est inhibée par l'induction d'HO-1 ou le traitement au CO (Figure 29-A). D'autre part, le traitement au CO maintient la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 induite par le LPS (Figure 29-B). Ces résultats confirment donc ce qui avait déjà été montré chez l'homme et la souris dans les précédents travaux de l'équipe (Annexe 1, (Remy et al., 2009)). Il faut également noter que la sécrétion du TNF α induite par le LPS est également inhibée par l'induction d'HO-1 ou le traitement CO (Annexe 1, (Remy et al., 2009)). Ainsi, HO-1 et le CO induisent donc des DCs de souris avec un profil tolérogène.

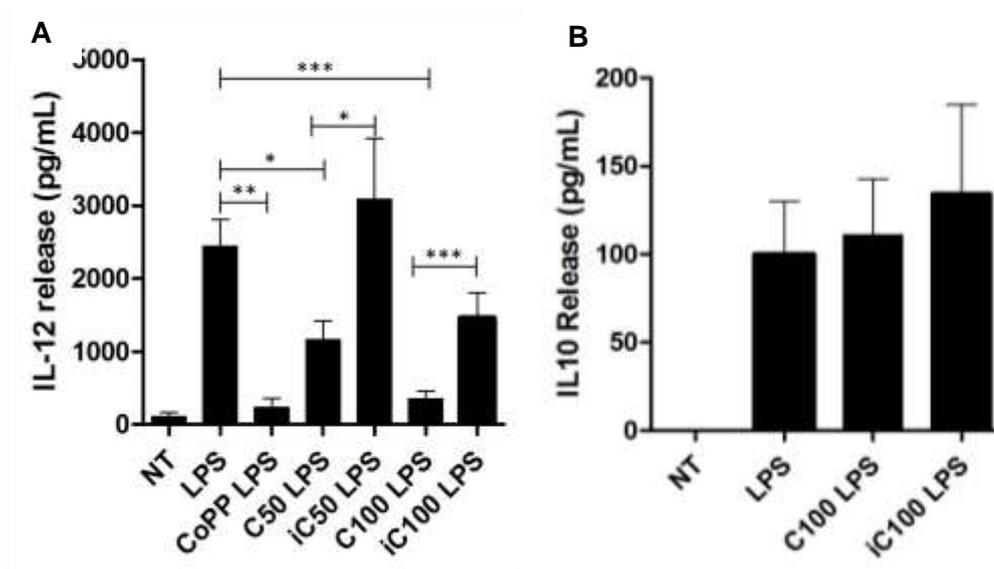


Figure 29. Production de cytokines par les BMDCs de souris

(A) Analyse, par Elisa, de la production d'IL-12p70, par les BMDC de souris traitées ou non avec 50 μ M CoPP (2h de traitement), 50 μ M ou 100 μ M CORM ou 50 μ M ou 100 μ M l'iCORM (contrôle du traitement CORM) (1h de traitement) puis stimulées au LPS (0,5 μ g/ml) pendant 20h. Les histogrammes représentent les moyennes de 6 à 7 expériences indépendantes. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à un t-test non paramétrique Mann-Whitney, $p < 0,05\%$ **(B)** Analyse, par Elisa, de la production d'IL-10, par les BMDC de souris traitées ou non 100 μ M CORM ou 100 μ M l'iCORM (contrôle du traitement CORM) (1h de traitement) puis stimulées au LPS (0,5 μ g/ml) pendant 20h. Les histogrammes représentent les moyennes de 5 expériences indépendantes. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à un ANOVA one-way non paramétrique suivi d'un post-test de Dunn's, $p > 0,05\%$.

A noter, toutes les viabilités des cellules après le traitement au CoPP et au CORM sont évaluées par cytométrie en flux par marquage au DAPI. De même, le phénotype et la sécrétion d'IL-12p70 sont vérifiés pour toutes les expériences effectuées à partir des DCs induite pour HO-1 ou traitées au CO.

C. Test de cross-présentation

Pour tester l'hypothèse qu'HO-1 ou le CO ont un rôle sur la cross-présentation par les DCs, j'ai d'abord réalisé des tests de présentation antigénique de l'ovalbumine (OVA) à l'aide du système des souris transgéniques OT-I, permettant l'obtention des cellules T CD8+ spécifiques du peptide SIINFEKL OVA₂₅₇₋₂₆₄. Après le traitement au CoPP, au CORM ou au CO gaz, les BMDCs sont incubées avec la protéine OVA (certifié sans LPS- EndoOVA, Hyglos, Allemagne) ou le peptide SIINFEKL OVA₂₅₇₋₂₆₄ et stimulées simultanément avec le LPS pendant 20h. Pour le traitement au CO gaz, nous avons utilisé la technique de 10min de pulse à 0.5L/ml avec le mélange gazeux contenant CO 450ppm+CO₂ 5%, qui est similaire au traitement CORM pour l'inhibition de la production de l'IL-12p70 par les BMDCs de souris après stimulation au LPS. Les BMDCs, ainsi chargées et activées, sont ensuite mises en co-culture avec les cellules T CD8+ OTI, purifiées par tri magnétique, pendant 18h. Les surnageants de co-culture sont récoltés et testés par Elisa pour la présence d'IL-2, comme témoin de l'activation des OT-I.

L'induction d'HO-1 ou le traitement au CO par le CORM ou le CO gaz rend les BMDCs incubées avec la protéine OVA significativement moins efficaces dans l'activation des cellules OT-I (Figure 30-A-B). A noter, pour le traitement au CO par le CORM, l'inhibition est significativement différente par rapport au contrôle iCORM, mais pas par rapport au LPS. Cela dit, l'inhibition de la production d'IL-2 après traitement est également validée par le traitement au CO par le COg. Inversement, HO-1 et le CO n'ont aucun effet sur la présentation antigénique des BMDCs après chargement directe du peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ sur les molécules du CMH de classe I (Figure 30-C-D). Ces résultats suggèrent qu'HO-1 ou le CO ont un impact sur les mécanismes de cross-présentation puisque l'antigène doit être internalisé et apprêté pour obtenir une activation moindre des cellules T OT-I.

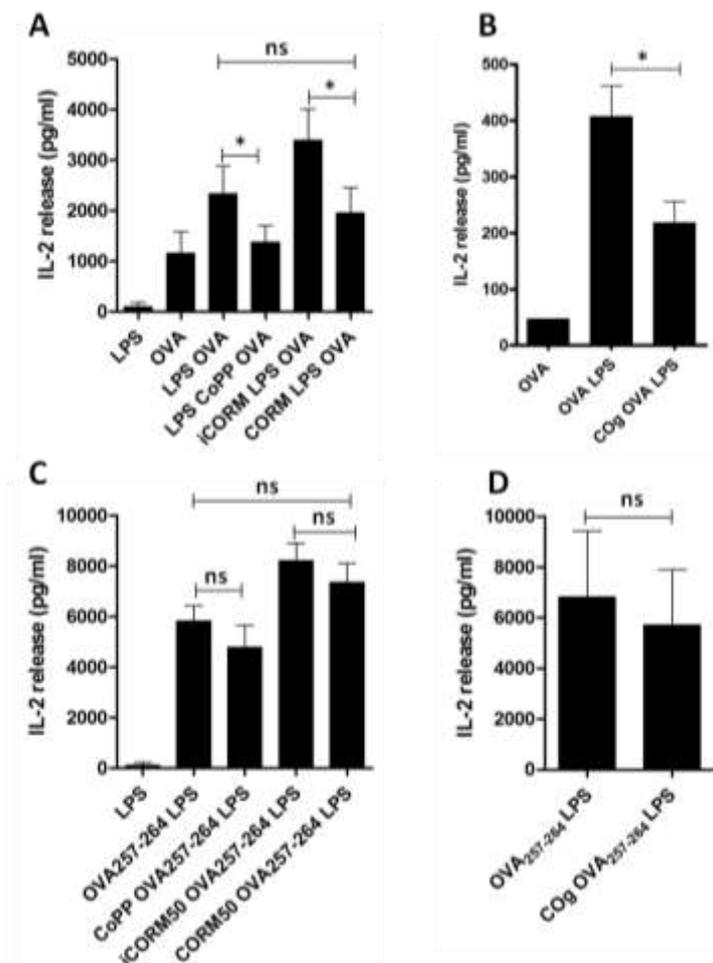


Figure 30. Test de cross-présentation et de présentation antigénique directe.

(A) Analyse de l'activation des cellules T OT-I après co-culture avec les BMDCs de souris incubées avec la protéine OVA. Les BMDC de souris traitées ou non avec 50µM CoPP (2h de traitement), 50µM CORM ou 50µM iCORM (contrôle du traitement CORM) (1h de traitement) puis stimulées au LPS (0,5µg/ml) et incubées avec la protéine OVA (50µg/ml) pendant 20h. Ces BMDCs sont ensuite mises en co-culture avec les cellules T OT-I à un ratio au ½ (25000 DCs-50000 OT-I) pendant 18h. Les surnageants sont récoltés pour l'évaluation de la sécrétion d'IL-2 par les cellules OT-I en Elisa. Les analyses statistiques entre les conditions LPS OVA et LPS CoPP OVA ont été réalisées grâce à un t-test non paramétrique Wilcoxon et représentent la moyenne de 6 expériences indépendantes, $p < 0.05\%$. Les analyses statistiques entre les conditions LPS OVA, iCORM LPS OVA et CORM LPS OVA ont été réalisées grâce à un anova one-way non paramétrique suivi d'un post-test de Dunn's et représentent la moyenne de 4 expériences indépendantes, $p < 0.05\%$ entre CORM et iCORM. **(B)** Analyse de l'activation des cellules T OT-I après co-culture avec les BMDCs de souris incubées avec la protéine OVA et traitées au CO gaz en pulse de 10min, débit 0.5L/min. Le protocole est le même qu'en (A). Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à un t-test non paramétrique Wilcoxon et représentent la moyenne de 6 expériences indépendantes, $p < 0.05\%$. **(C)** Le protocole est le même qu'en (A), mise à part que les BMDCs sont chargées avec 10nM de peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄. Les analyses statistiques entre la condition LPS OVA et LPS CoPP OVA ont été réalisées grâce à un t-test non paramétrique Wilcoxon et représentent la moyenne de 6 expériences indépendantes. Les analyses statistiques entre les conditions LPS OVA, iCORM LPS OVA et CORM LPS OVA ont été réalisées grâce à un anova one-way non paramétrique suivi d'un post-test de Dunn's et représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes, $p > 0.05\%$. **(D)** Le protocole est le même qu'en (C), mise à part que les BMDCs sont traitées au CO gaz en pulse de 10min, débit 0.5L/min. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à un t-test non paramétrique Wilcoxon et représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes, $p > 0.05\%$.

D. Etude de la capture antigénique

Nous avons ensuite cherché les mécanismes par lesquels HO-1 et le CO pouvaient influencer sur la capacité des BMDCs à activer les OT-I suite à la cross-présentation des antigènes exogènes. Pour cela, nous nous sommes d'abord intéressés à l'impact d'HO-1 et du CO sur les capacités de capture antigénique des BMDCs. Nous avons étudié deux principaux mécanismes de capture antigénique : l'endocytose médiée par les récepteurs au mannose, avec la protéine OVA couplée au fluorochrome Alexa 488 (Alexa-488-OVA) et à la phagocytose avec des billes de latex d'1µm couplées au fluorochrome phycoéritrine (Beads-PE).

1. Endocytose médiée par les récepteurs au mannose

Comme précédemment, après traitement des BMDCs avec le CoPP (50µM) ou le CORM (50µM), les cellules sont simultanément maturées au LPS et incubées avec l'Alexa 488-OVA (100µg/ml) pendant 15 min, 30 min, 1h, 3h et 20h. Un contrôle à 4°C, qui permet l'inhibition de la capture antigénique et la quantification du bruit de fond lié à l'accrochage non spécifique de l'Alexa 488-OVA aux cellules est inclus pour chaque temps d'incubation. La Figure 31 A et B propose une analyse en pourcentage d'augmentation de la moyenne de fluorescence au cours du temps pour chaque condition. Ces résultats montrent que l'induction d'HO-1 ou le traitement au CO ne diminuent pas la capacité de capture antigénique par l'endocytose médiée par les récepteurs au mannose. Au contraire, on observe même une augmentation significative de la capture antigénique pour les BMDCs sur-exprimant HO-1 à 20h.

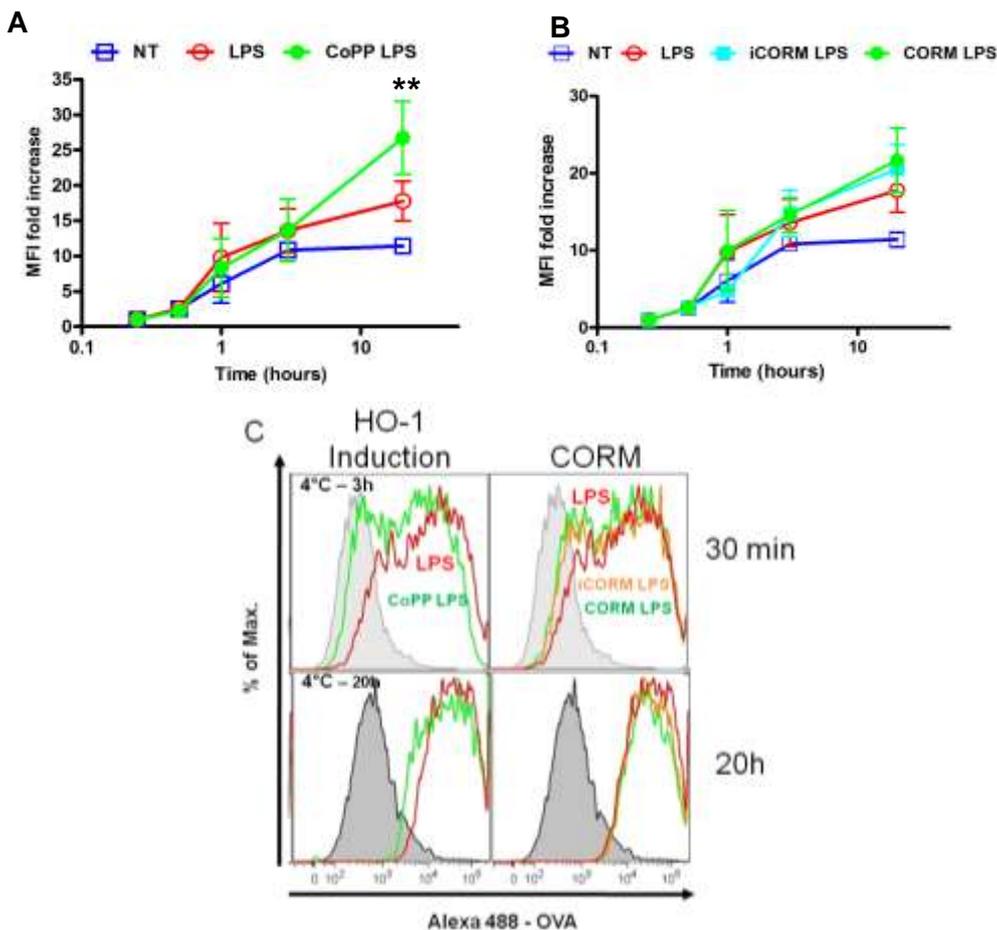


Figure 31. Etude de la capture antigénique des BMDCs par endocytose médiée par les récepteurs au mannose.

(A) Analyse de l'effet d'HO-1 et (B) du CORM ou son contrôle iCORM sur la capture antigénique par endocytose médiée par les récepteurs au mannose. Moyennes de 3 expériences indépendantes. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à un test ANOVA two-way non paramétrique, suivi d'un post test de bonferonni ; $p < 0.05$ (C) Figure représentative d'une analyse par cytométrie en flux de la capture antigénique de l'Alexa-OVA-488 par les BMDCs après induction d'HO-1 ou traitement au CO.

La capture antigénique par endocytose a également été étudiée sur des BMDCs traitées au CoPP et au CORM et maturées pendant 20h au LPS. Après maturation, les BMDCs sont incubées avec l'Alexa 488-OVA avec la même cinétique que précédemment. Aucune différence dans la capture antigénique n'a été observée, que les cellules aient été traitées au non par le CO ou pour l'induction d'HO-1 (données non montrées).

Ainsi, HO-1 et le CO ne modifient pas la capacité de capture antigénique par endocytose médiée par récepteur au mannose.

2. Phagocytose

L'impact d'HO-1 et du CO a également été étudié sur la phagocytose. Après traitement des BMDCs par le CoPP (50µM) ou le CORM (50µM), comme précédemment décrit, les BMDCs sont maturées au LPS pendant 20h, puis incubées avec des billes-PE pendant

30min, 1h ou 2h. Un contrôle à 4°C est inclus pour quantifier le bruit de fond causé par l'accrochage non spécifique des billes sur la surface cellulaire.

Les résultats montrent que ni HO-1, ni le CO n'ont un effet sur la capacité de phagocytose des BMDCs. Le CO induit cependant une baisse très légère de la phagocytose par les BMDCs après 30min d'incubation avec les billes de latex (Figure 32).

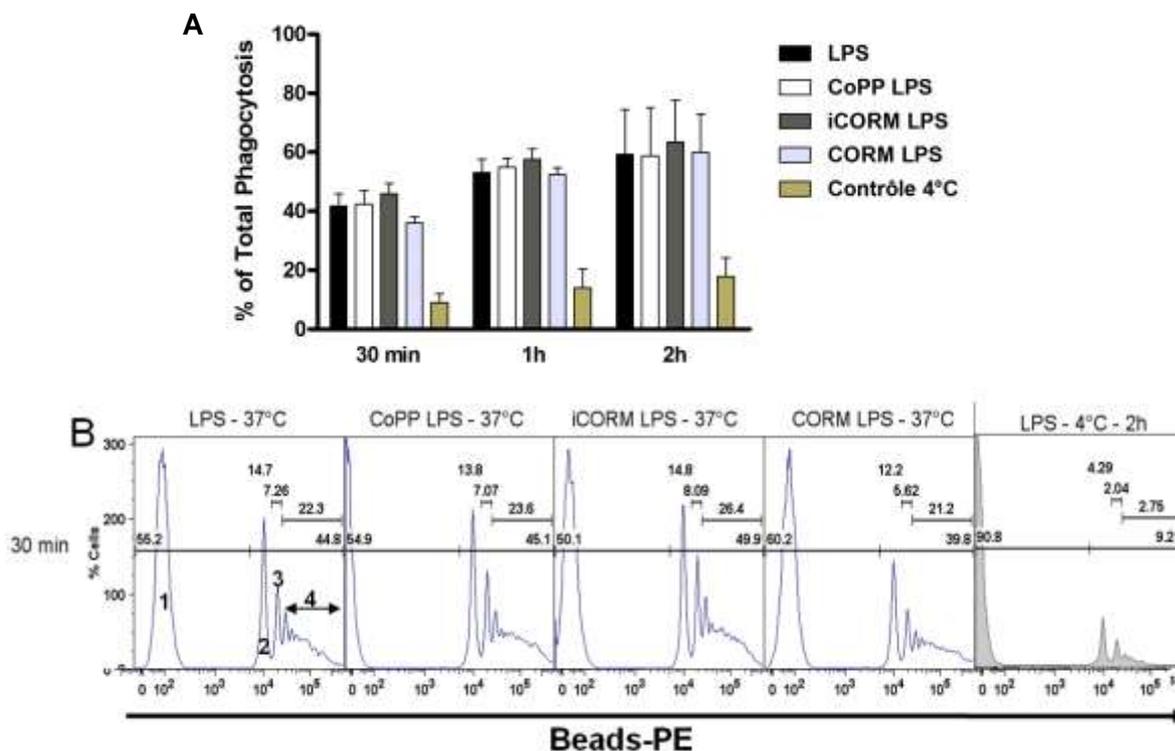


Figure 32. Etude de l'effet d'HO-1 et du CO sur la phagocytose par les BMDCs.

(A) Analyse de la phagocytose par les BMDCs traitées au CoPP ou au CORM et son contrôle, et maturées 20h au LPS, après 30min, 1h ou 2h d'incubation avec les billes de latex-PE. L'histogramme représente la moyenne de 3 expériences indépendantes. **(B)** Figure représentative de l'analyse, par cytométrie de flux, de la capture antigénique par phagocytose des BMDCs après induction d'HO-1 ou traitement au CO après 30min d'incubation avec les billes de latex. Le pic 1 correspond aux cellules n'ayant pas phagocyté, le pic 2 aux cellules ayant phagocyté une bille, le pic 3 aux cellules ayant phagocyté 2 billes, l'intervalle 4 aux cellules ayant phagocyté plus de 2 billes. L'histogramme en A représente le pourcentage de phagocytose totale, c'est-à-dire le pourcentage total de cellules ayant phagocyté 1, 2 ou plus de 2 billes.

E. Quantification des complexes CMH-I-peptide

Puisque la capture antigénique des BMDCs n'est pas affectée ni par le CO, ni par HO-1, une autre hypothèse est que le nombre de complexes CMH-I-peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ présents à la surface cellulaire des BMDCs puisse être affectée par le traitement au CO ou l'induction d'HO-1.

Nous avons d'abord vérifié que le traitement au CO ou l'induction d'HO-1 ne modifiait pas l'expression des molécules de classe I par les BMDCs maturées au LPS. La Figure 33 montre que ni le CO, ni HO-1 ne modifie l'expression des molécules du CMH-I induite par le LPS.

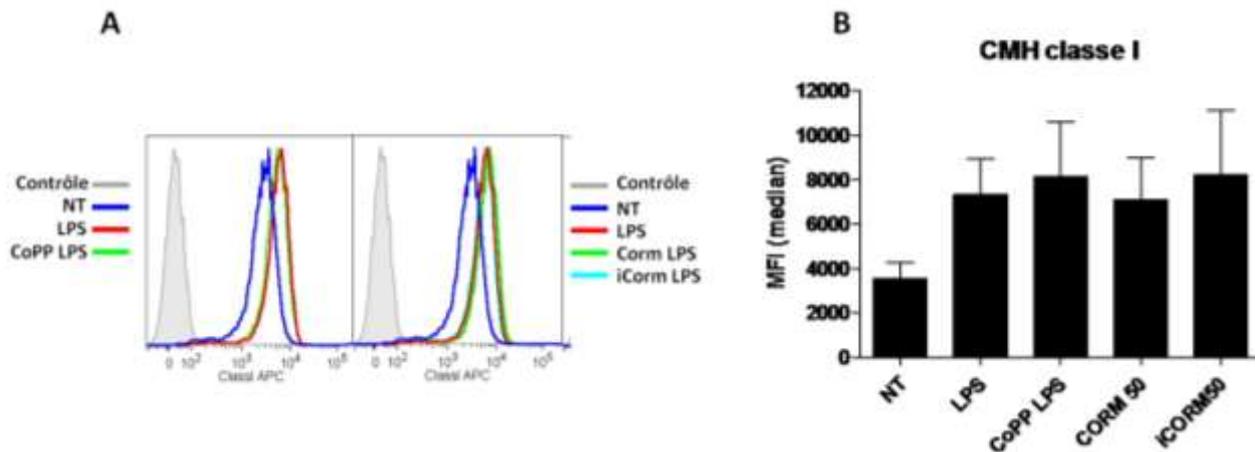


Figure 33. Analyse de l'expression des molécules du CMH de classe I par les BMDCs traitées au CO ou sur-exprimant HO-1.

(A) Analyse, par cytométrie en flux, de l'expression du CMH-I, par les BMDC de souris traitées ou non avec 50 μ M CoPP (2h de traitement), 50 μ M CORM ou 50 μ M l'iCORM (contrôle du traitement CORM) (1h de traitement) puis stimulées au LPS (0,5 μ g/ml) pendant 20h. Représentative d'une expérience. (B) Histogramme de la moyenne des médianes de fluorescence obtenues pour l'expression du CMH-I obtenues dans 4 expériences indépendantes.

Nous avons ensuite tenté d'analyser l'expression des complexes CMH-I-peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ par cytométrie en flux, grâce à un anticorps spécifique de ces complexes, le 25D116, dont l'hybridome nous a été généreusement donné par le Dr Ronald Germain. Nous avons ensuite purifié cet anticorps à partir des surnageants de culture de l'hybridome et estimé la concentration de l'anticorps après sa purification. Les BMDCs, après traitement au CoPP ou au CORM, sont simultanément maturées au LPS et incubées soit avec la protéine OVA (50 μ M) ou le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ (1 μ M) pendant 20h. Des contrôles négatifs sans peptide ni protéine sont inclus. Les BMDCs sont ensuite incubées pendant 4h avec l'anticorps 25D116 à 10 μ g/ml, à 4°C.

L'utilisation de cet anticorps par cytométrie en flux, nous a posé plusieurs problèmes. Cet anticorps permet de détecter les complexes CMH-peptide formés après incubation des cellules avec la protéine OVA, uniquement quand les cellules ne sont pas maturées au LPS. Cela dit, nous observons également une réactivité de l'anticorps pour la condition sans OVA et sans LPS, qui suggère une réactivité croisée de l'anticorps avec les molécules du CMH-I (Figure 34-A). Quand les BMDCs sont maturées, on ne distingue plus la différence entre le contrôle LPS (sans la protéine) et la condition LPS avec la protéine (Figure 34-A). Cela dit,

avec le peptide, il reste possible de détecter un signal même après maturation des BMDCs (Figure 34-A). Ainsi, avec la protéine, on peut s'imaginer que les complexes CMH-I-peptide OVA formés ne soient pas en nombre suffisant pour pouvoir être détecté par l'anticorps, contrairement à ce qu'il se passe avec le peptide. L'évaluation des complexes CMH-I-peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ formés à la suite de l'apprêtement de la protéine OVA par cet anticorps semble être difficilement réalisable, puisqu'il présente un seuil de détection limité des complexes CMH-I-peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ par cytométrie en flux. Ceci est d'autant plus vrai que les concentrations de peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ utilisées pour avoir un signal avec cet anticorps sont 100 fois plus élevées que lors des tests de cross-présentation.

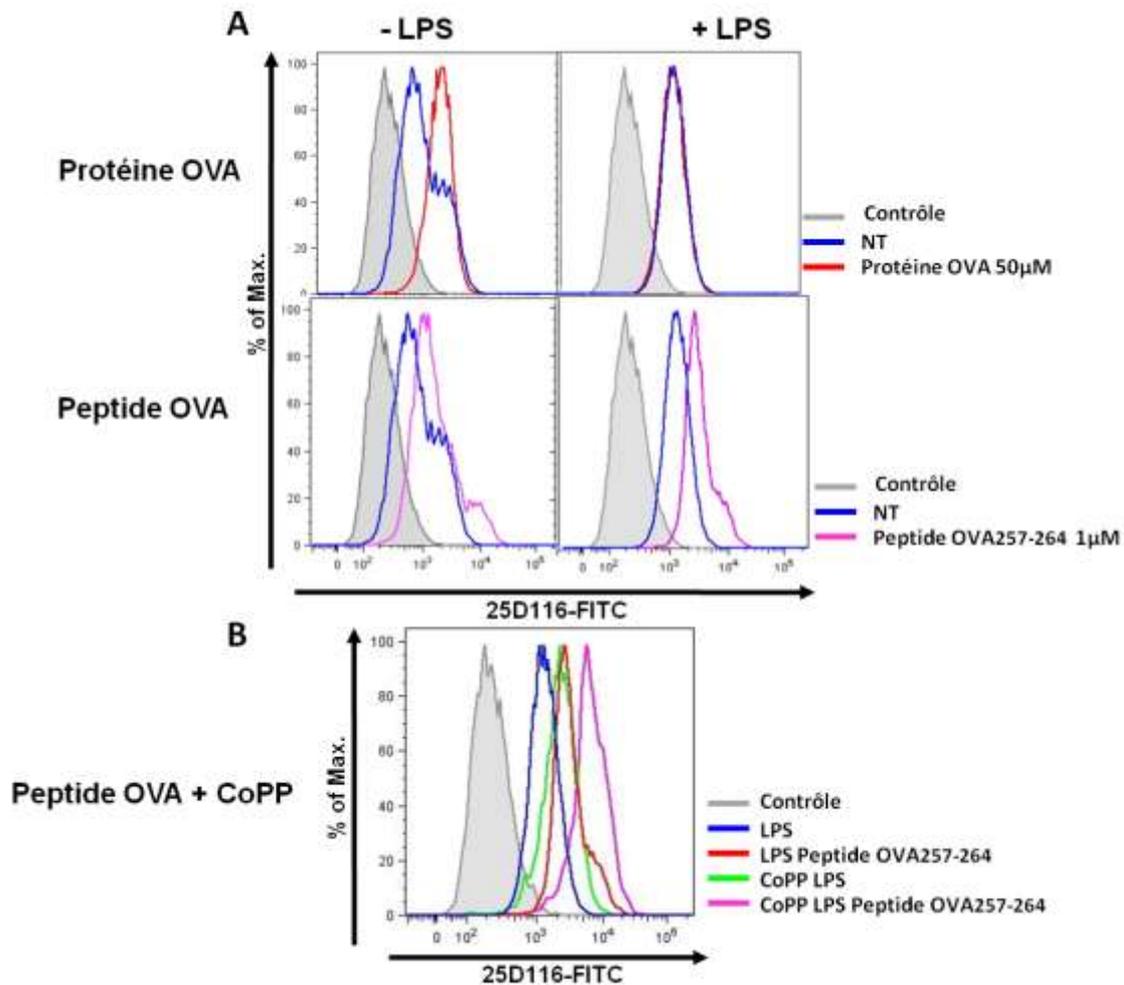


Figure 34. Etude de l'expression des complexes CMH-I-peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ par les BMDCs de souris traitées au CO ou sur-exprimant HO-1.

(A) Analyse, par cytométrie en flux, de l'expression des complexes CMH-I-peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄, par les BMDC de souris stimulées ou non au LPS (0,5µg/ml) et traitées ou non avec 50µM de protéine OVA ou 1µM de peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ pendant 20h. Représentative d'une expérience. **(B)** Analyse, par cytométrie en flux, de l'expression des complexes CMH-I-peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄, par les BMDC de souris traitées ou non avec 50µM de CoPP (2h) puis stimulées au LPS (0,5µg/ml) et traitées ou non 1µM de peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ pendant 20h. Représentative d'une expérience indépendante. (NT : Cellules non traitées)

Un autre inconvénient de cet anticorps est que les traitements des BMDCs avec le CoPP (le CORM et l'iCORM, également, données non montrées) induisent également un bruit de fond sans qu'aucun antigène (protéine ou peptide) ne soit présent. Ce bruit de fond rend impossible la comparaison du signal de fluorescence entre les conditions LPS-peptide et CoPP-LPS-peptide, puisque le signal de base de la condition CoPP LPS se confond avec la condition LPS-peptide (Figure 34-B).

Bien que différentes stratégies aient été envisagées pour améliorer ces résultats (augmentation des concentrations de protéine OVA utilisées, utilisation de l'anticorps 2.4G2 bloquant les récepteurs Fc, amplification du signal avec un secondaire biotinylé puis un tertiaire couplé streptavidine, couplage de l'anticorps 25D116 avec un fluorochrome, test de plusieurs temps d'incubation des cellules avec l'anticorps), cet anticorps ne semble pas assez sensible pour étudier une différence en nombre de complexes CMH-I-peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄, tout du moins en cytométrie en flux.

Cela dit, dans le cadre d'un autre projet avec l'école vétérinaire, qui porte sur l'étude de l'impact des récepteurs β_2 -adrénergiques sur la biologie des DCs et dans lequel j'interviens notamment pour les techniques liées à l'étude de la cross-présentation, cet anticorps a été utilisé en microscopie confocale et il donne de meilleurs résultats qu'en cytométrie. Nous pourrions, de plus, étudier en microscopie confocale la colocalisation du signal du 25D116 dans les endosomes ou phagosomes. L'étude de l'impact d'HO-1 et du CO sur l'expression des complexes CMH-I-peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ par les BMDCs est donc en cours de réalisation par microscopie confocale

F. Etude de la dégradation antigénique

Nous avons également étudié si le CO ou HO-1 avait un impact sur les mécanismes de dégradation antigénique nécessaire à l'apprêtement antigénique des antigènes sur les molécules du CMH. Deux outils nous ont permis de réaliser cette étude : une méthode basée sur l'endocytose par les BMDCs du DQ-OVA et une autre basée sur la phagocytose de billes de polystyrène couplées de façon covalente à l'ovalbumine par les BMDCs.

1. Analyse de la dégradation par le DQ-OVA

Le DQ-OVA est une molécule conjuguée à l'ovalbumine qui libère sa fluorescence sous dégradation protéolytique de l'ovalbumine. Pour ces expériences, les BMDCs sont traitées comme précédemment avec le CoPP, pour induire l'expression d'HO-1 ou avec le CORM. Après 20h de maturation au LPS, les BMDCs sont incubées avec 10 μ g/ml de DQ-

OVA pendant 30 min, 1h ou 1h30. Un contrôle à 4°C est inclus pour évaluer le bruit de fond de la molécule.

Comme le montre la Figure 35, ni le traitement au CO, ni l'induction d'HO-1 n'a d'effet sur la dégradation DQ-OVA, puisque les BMDCs traitées au LPS ou avec l'iCORM-LPS décrivent un profil de fluorescence du DQ-OVA similaire aux BMDCs traitées au CoPP-LPS ou au CORM-LPS.

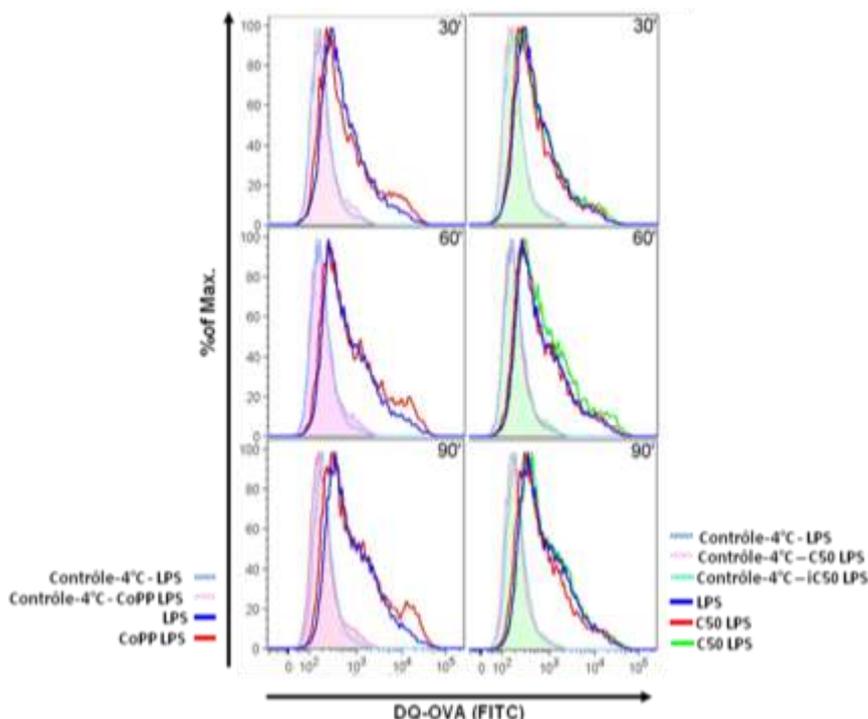


Figure 35. Dégradation antigénique du DQ-OVA par les BMDCs de souris après induction d'HO-1 ou traitement au CO.

Analyse de la fluorescence émise par le DQ-OVA reflétant la capacité de dégradation des BMDCs traitées au CoPP ou au CORM et son contrôle, et maturées 20h au LPS, après 30min, 1h ou 1h30 d'incubation avec le DQ-OVA. Représentative de 2 à 3 expériences indépendantes.

2. Etude de la dégradation antigénique après phagocytose d'antigène particulaire

Nous avons également étudié la dégradation antigénique après phagocytose de billes de polystyrène couplée de façon covalente avec l'ovalbumine. Pour cela, les BMDCs sont traitées comme décrit précédemment au CoPP et au CORM. Après 2h de maturation au LPS, les BMDCs sont incubées avec les billes-OVA. Après un lavage important des cellules pour éliminer l'excédent de billes, les BMDCs sont incubées à 37°C pendant 30min, 1h ou 2h. Un contrôle avec un inhibiteur de protéase (Pic : protease inhibitor cocktail) est inclus comme contrôle négatif de la protéolyse. Pour chaque condition, un temps « pulse » (0 min)

correspondant au bruit de fond de l'expérience est récolté. A la fin de chaque point de cinétique, les cellules sont récoltées et lysées sur la nuit à 4°C pour récupérer uniquement les billes-OVA internalisées par les BMDCs. Les billes-OVA sont ensuite marquées avec un anticorps anti-OVA. Ce marquage reflète le degré de dégradation de la protéine OVA : plus le marquage diminue, plus la protéine OVA est lysée (Figure 36-A 2).

La Figure 36 montre la progression au cours du temps de la protéolyse de l'ovalbumine couplée aux billes, issues des phagosomes des BMDCs sur-exprimant HO-1 (Figure 36-B) ou traitées au CO (Figure 36-C) en comparaison avec les conditions contrôles. La protéolyse de l'ovalbumine est effective à partir d'1h d'incubation, si l'on se réfère au temps d'incubation 0min. Une très légère augmentation non significative de la protéolyse est observée à 30 min pour les billes issues des phagosomes des BMDCs traitées au CO ou sur-exprimant HO-1 par rapport à la condition LPS ou iCORM LPS pour le CO. Au cours du temps, la protéolyse de l'ovalbumine devient similaire que les billes soient issues des phagosomes des BMDCs traitées au LPS, au CO ou sur-exprimant HO-1. Pour confirmer ce résultat, la protéolyse de l'OVA va également être étudiée après incubation des billes à des temps plus long. Ainsi, les BMDCs sur-exprimant HO-1 ou traitées au CO montrent une capacité de protéolyse des antigènes particulières préservée. Nous pouvons donc conclure que ni l'induction d'HO-1, ni le traitement au CO n'altère les capacités de dégradation antigénique des DCs.

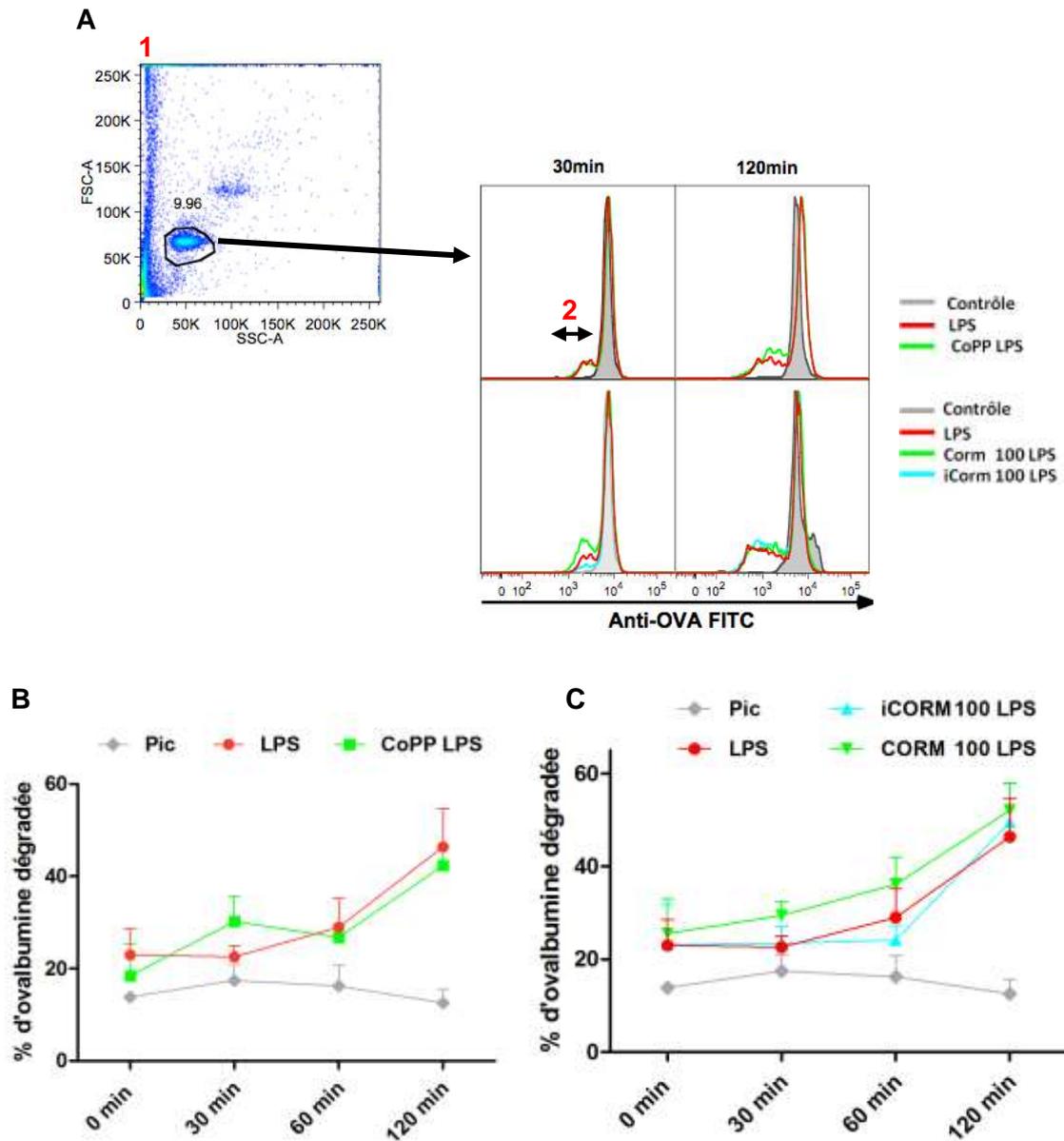


Figure 36. Etude de la dégradation phagosomale de l'ovalbumine

Les BMDCs sont traitées soit avec 50µM de CoPP ou 100µM de CORM ou de la forme inactive de CORM et stimulées au LPS pendant 2h. Les BMDCs sont ensuite incubées à 37°C pendant 10min avec des billes couplées de façon covalente avec l'ovalbumine. Après le lavage des cellules, celles-ci sont incubées pendant 30min, 1h ou 2h à 37°C pour permettre la protéolyse de l'ovalbumine. Après lyse des cellules, les billes sont récupérées et marquées avec un anticorps anti-OVA. **(A)** Figure représentative d'une analyse par cytométrie en flux de la dégradation de l'OVA couplée de façon covalente sur des billes de polystyrène 3µm. **(1)** Figure de morphologie. L'analyse est ciblée sur la morphologie des billes. **(2)** Le pourcentage de dégradation de l'OVA est obtenu par la diminution de la fluorescence du marquage anti-OVA. **(B)** Le graphique montre une comparaison de la progression de la protéolyse en fonction du temps entre les BMDCs traitées au CoPP LPS et celles traitées au LPS. **(C)** Le graphique montre une comparaison de la progression de la protéolyse en fonction du temps entre les BMDCs traitées au CORM LPS et celles traitées au LPS ou à l'iCORM LPS. **(B)** et **(C)** représentent la moyenne du % d'OVA dégradée obtenu pour 4 expériences indépendantes.

La capacité de dégradation du phagosome étant liée à la régulation du pH phagosomal dans les DCs, nous nous sommes donc intéressés à une éventuelle interaction entre la NADPHoxydase, qui, comme nous l'avons vu dans l'introduction, régule le pH phagosomal et HO-1 ou le CO.

G. Interaction avec la NADPHoxydase

La NADPHoxydase est une enzyme qui contient plusieurs sous-unités dont la gp91^{phox} (NOX2), qui est composée de 2 hèmes. Chez le macrophage, l'induction d'HO-1 induit une complète dégradation de la NOX2 par consommation des réserves d'hème intracellulaires (Taille et al., 2004) et le CO bloque l'activité de la NOX2 par fixation aux hèmes de la NOX2, ce qui induit une diminution de la production des réactifs oxygénés qui inhibe la signalisation du TLR4, qui n'est plus recruté au niveau des radeaux lipidiques (Nakahira et al., 2006; Taille et al., 2005). De plus, la NADPHoxydase appartient à la famille des protéines NOX génératrices de réactifs oxygénés et nous avons précédemment montré que l'expression d'HO-1 diminue la production des réactifs oxygénés dans les DCs humaines maturées au LPS (Chauveau et al., 2005).

Nous avons donc examiné l'expression de la gp91^{phox} par western blot dans les BMDCs traitées ou non au CoPP et au CORM, dans les mêmes conditions que précédemment, puis maturées au LPS pendant 20h.

Aucune différence dans l'expression de la gp91^{phox} n'a été relevée parmi les différentes conditions testées (Figure 37).

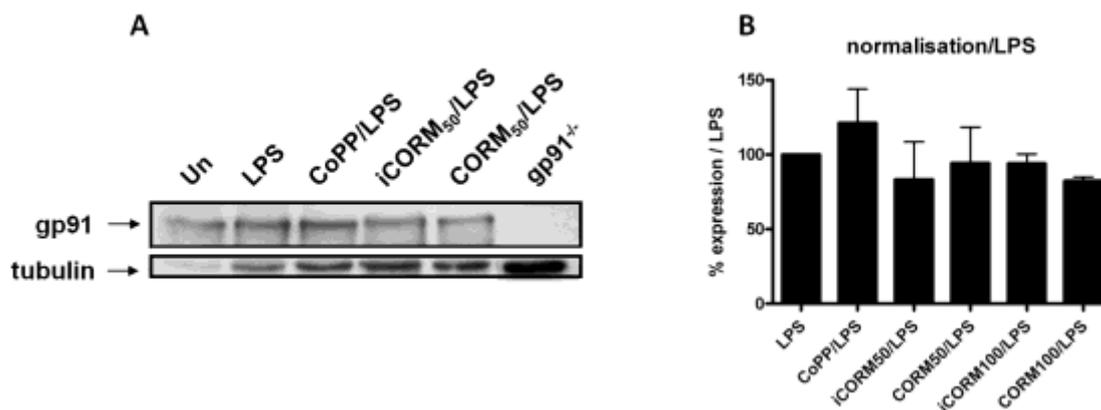


Figure 37. Etude de l'expression de la gp91^{phox} après traitement au CO ou induction d'HO-1

Les BMDCs sont traitées soit avec 50 μ M de CoPP ou 50 μ M ou 100 μ M de CORM ou 50 μ M de la forme inactive de CORM et stimulées au LPS pendant 16h. Des extraits protéiniques provenant de DC gp91^{phox} -/- sont utilisées comme contrôle négatif. La figure (A) est représentative de 3 expériences indépendantes pour l'expression de gp91^{phox}. Un anticorps anti- β tubuline est utilisé comme contrôle de chargement. L'histogramme montre une analyse par densitométrie \pm SEM des signaux du western blot pour la gp91^{phox} après normalisation avec la β -tubulin et représente la moyenne de 3 expériences indépendantes. (B).

Cela dit, l'étude de la fixation du CO sur le cytochrome b558, formé par les deux sous-unités membranaires de la NADPHoxydase, p22^{phox} et gp91^{phox}, est en cours de réalisation par analyse spectrophotométrique.

D'autre part, l'étude de la production des ROS au niveau des phagosomes est également envisagée.

H. Interaction d'HO-1 et du CO avec un système bactérien

La protéolyse des antigènes particuliers a aussi été analysée à l'aide d'un système bactérien particulièrement intéressant pour cette étude. En effet, l'équipe chilienne d'Alexis Kalergis a montré que la *Salmonella typhimurium* possède un mécanisme d'échappement aux réponses immunitaires grâce à l'expression de gènes Spi-2 (*Salmonella* Pathogenicity Island-1). Ces gènes Spi-2 permettent à la bactérie de survivre à l'intérieur de la DCs et d'échapper à la présentation antigénique, notamment en inhibant la fusion phago-lysosomale (Tobar et al., 2006; Bueno et al., 2005, 2010). Cette inhibition de la fusion phago-lysosomale réduit l'activation et la réponse des cellules T CD4⁺ et des cellules T CD8⁺ en diminuant la quantité de peptides, dérivés des antigènes de la *Salmonella*, produite par la DC et chargée sur les molécules de CMH-I et CMH-II. L'équipe d'Alexis Kalergis possède différentes souches de *Salmonella Typhimurium* : les sauvages virulentes (14028s), les mutantes pour Δ Spi-2 atténuées (dont la fusion phagolysosomale est rétablie et la survie à l'intérieur des DCs est diminuée). Ces deux souches ont également été transfectées avec le plasmide pkk-

OVA codant pour l'OVA (14028s-OVA et Δ Spi-2-OVA, respectivement la souche sauvage et mutante), qui permettent la réalisation de test de cross-présentation.

Nous avons d'abord voulu savoir si HO-1 ou le CO avait un impact sur la survie des bactéries. Après avoir traitées les BMDCs au CoPP ou au CORM, celles-ci sont infectées avec les souches sauvages et mutantes Δ Spi-2 de la bactérie. Après l'infection bactérienne, les bactéries sont éliminées du milieu par traitement antibiotique puis une quantité précise de DCs est lysée et étalée dans des boîtes de pétri pour permettre la croissance des bactéries. Le dénombrement des colonies bactériennes permet d'avoir une idée de la survie bactérienne à l'intérieur des DCs.

Alors que le traitement des DCs par HO-1 ou le CO n'a aucun effet sur la survie de la souche sauvage 14028s de la *Salmonella Typhimurium*, la survie de la bactérie atténuée Δ Spi-2 est augmentée par l'induction d'HO-1 ou le traitement au CO des DCs (Figure 38). Ces résultats suggèrent donc qu'HO-1 ou le CO pourrait agir sur les mécanismes de survie de la bactérie, notamment en empêchant la fusion phagolysosomale, qui permet une moins bonne élimination de la bactérie.

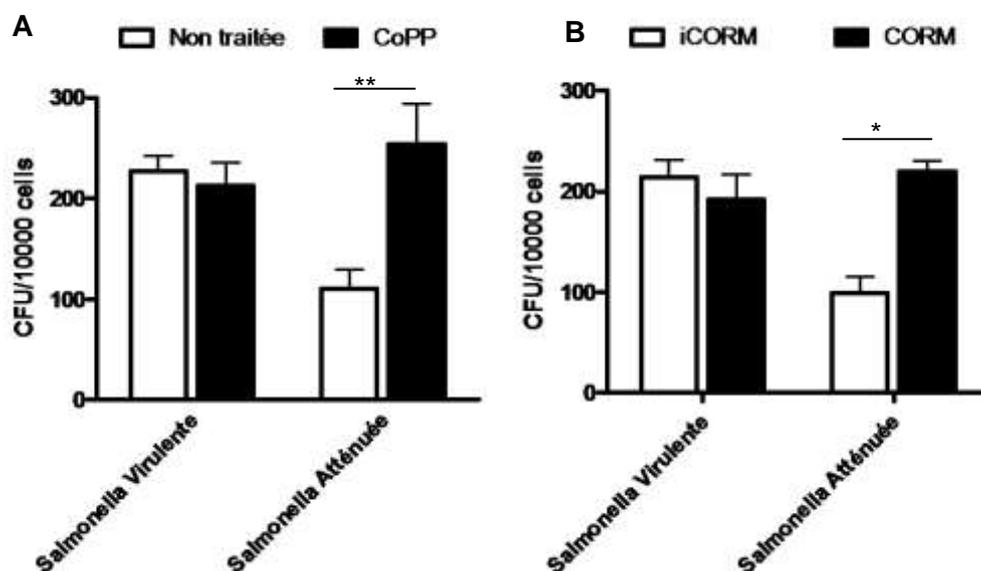


Figure 38. Etude de l'effet d'HO-1 et du CO sur la survie de la *Salmonella Typhimurium*

Les DCs sont soit non traitées ou traitées avec 50 μ M de CoPP (A), 50 μ M de CORM (B) ou 50 μ M de la forme inactive du CORM (B). Après traitement, les DCs sont infectées avec la souche 14028s de *Salmonella typhimurium* virulente, ou la souche atténuée Δ Spi-2. Après 1 h d'infection, 50 μ g/ml de gentamicine sont ajoutés et 24 h après, la survie bactérienne dans les DCs est déterminé par étalement bactérien des cellules lysées. Les histogrammes représentent la moyenne de 4 (A) et 3 (B) expériences indépendantes \pm SE. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à un test ANOVA two-way non paramétrique, suivi d'un post test de bonferonni ; $p < 0.05$

Grâce à la souche bactérienne Δ Spi2-OVA, nous avons pu tester l'impact de l'induction d'HO-1 sur la cross-présentation de la souche atténuée de la *Salmonella Typhimurium*. Le traitement au CoPP et l'infection ont été réalisés suivant le protocole décrit précédemment. Après élimination des bactéries du milieu de culture par traitement antibiotique, les DCs ont été mises en co-culture avec des cellules T CD8+ OT-I pendant 16h. Le résultat présenté par la Figure 39 représente une expérience préliminaire réalisée en cinpliquat et manque du contrôle réalisé avec la *Salmonella Typhimurium* sauvage 14028s exprimant l'ovalbumine. L'induction d'HO-1 dans les DCs inhibe la cross-présentation de l'ovalbumine issue de la souche atténuée Δ Spi2-OVA de la bactérie *Salmonella Typhimurium*. Ainsi, l'induction d'HO-1 et du CO augmente la survie de la bactérie par un mécanisme qui pourrait être lié à un blocage de la dégradation de la bactérie atténuée Δ Spi2 et pourrait inhiber sa cross-présentation aux cellules T CD8+.

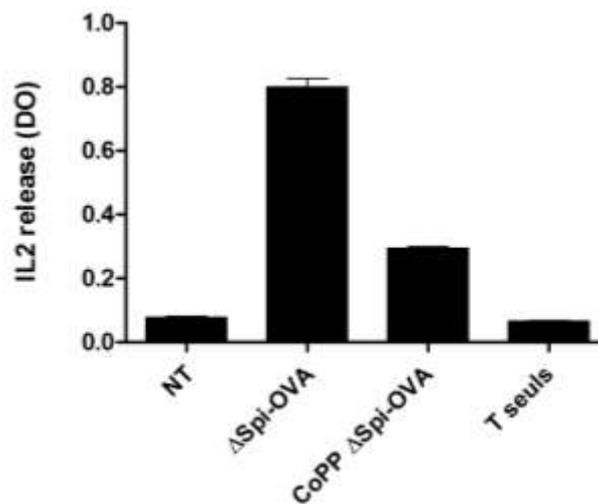


Figure 39. Test de cross-présentation réalisée avec la souche bactérienne *Salmonella Typhimurium* atténuée (Δ Spi-2-OVA) exprimant l'ovalbumine.

Les DCs sont soit non traitées ou traitées avec 50 μ M de CoPP. Après traitement, les DCs sont infectées avec la souche atténuée Δ Spi-2-OVA. Après 1 h d'infection, 50 μ g/ml de gentamicine sont ajoutés pour les cellules infectées par la bactérie. Après 24h, les DCs sont co-cultivées avec des cellules T OT-I. L'activation des cellules T est évaluée par Elisa pour la sécrétion d'IL-2. Résultat préliminaire représentatif d'une expérience en cinpliquat.

III-Conclusion

Ces résultats montrent donc que l'induction d'HO-1 ou le traitement au CO (par le CORM ou le CO gaz) induit une inhibition significative de la cross-présentation des antigènes aux cellules OT-I. Les résultats ayant été obtenus avec le traitement au CO gaz par pulse de 10min devront être reproduits avec le traitement au CO gaz en chambre hermétique, qui est le traitement le plus proche du traitement CORM, au niveau du maintien de la production de l'IL-10 par les DCs (le CORM et le CO gaz en chambre hermétique maintiennent la production d'IL-10 par les DCs après stimulation du TLR4, alors que le traitement par CO gaz en pulse augmente significativement la production de l'IL-10 par les DCs).

Nous montrons que cet effet est indépendant de la capture et de la dégradation antigénique après endocytose ou phagocytose des antigènes. Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer si HO-1 ou le CO influent sur l'activité de la NADPHoxydase, et si cela pourrait contribuer à l'inhibition de la cross-présentation par ces deux molécules. D'autres hypothèses pourraient expliquer cette inhibition, comme le blocage du passage des antigènes du phagosome ou de l'endosome vers le cytosol. Toutes ces hypothèses sont discutées dans la partie discussion qui suit.

Enfin, nous montrons que HO-1 et le CO peuvent améliorer la survie de la bactérie *Salmonella Typhymurium* atténuée Δ Spi2. De plus, la cross-présentation des antigènes issus de *Salmonella Typhymurium* atténuée Δ Spi2 est inhibée après l'induction par HO-1. Ces résultats étant préliminaires, il est nécessaire de les confirmer, notamment après traitement au CO. Ces résultats suggèrent que HO-1 ou le CO pourraient interagir sur la survie des bactéries en inhibant les mécanismes de dégradation antigénique mis en place par la DCs. Ces résultats semblent en contradiction avec les précédents, obtenus avec les billes-OVA. Cela dit, ces deux types d'étude ne sont certainement pas comparables, puisque le système bactérien repose sur l'infection de la DCs par un organisme vivant pouvant interagir avec la biologie de la DC. Ces divergences seront discutées dans la partie discussion suivante. Par ailleurs, il a été montré que si la souche de *Salmonella Typhymurium* virulente 14028s est neutralisée par des anticorps pour cibler les récepteurs Fc de la DC, les mécanismes d'échappement de la bactérie sont contournés et les antigènes bactériens sont cross-présentés par la DCs par ré-orientation de la bactérie dans la voie de dégradation lysosomale (Tobar et al., 2004). Il serait donc intéressant d'analyser l'effet du CO et d'HO-1 dans un tel contexte.

DISCUSSION

I- Le rôle du CO dans la protection contre l'auto-immunité *via* les DCs : le diabète auto-immun de type I.

Jusqu'à présent les études qui ont montré qu'HO-1 ou le CO amélioraient l'issue pathogénique de la maladie dans des modèles d'allergie (Kirino et al., 2008; Listopad et al., 2007; Xia et al., 2006) ou d'auto-immunité comme le T1D (Li et al., 2007b; Hu et al., 2007) ou l'EAE (Chora et al., 2007) étaient réalisées après l'augmentation de l'expression d'HO-1 ou le traitement au CO gaz de façon systémique. Pour nos travaux sur le T1D, nous avons utilisé des DCs traitées au CO gaz ou au CORM pour tenter de comprendre les mécanismes d'action de cette molécule sur les réponses immunitaires, notamment induites par les DCs. De cette façon, nous avons pu analyser plus finement les effets protecteurs du CO et d'HO-1, spécifiques des DCs dans le contexte du T1D, qu'un mode de traitement systémique ne peut pas permettre du fait de l'action du CO et d'HO-1 sur d'autres types cellulaires. En plus de leur capacité à polariser différents types cellulaires impliqués dans le T1D (comme les cellules T NK, CD4+, et CD8+), les DCs sont retrouvées en nombre inférieur dans le pancréas après l'augmentation de l'expression d'HO-1 chez la souris NOD (Li et al., 2007b). Un autre étude a montré que la sur-expression d'HO-1 après injection d'un AAV (Adeno-associated virus) codant pour HO-1 chez la souris NOD réduit le pourcentage de cellules CD11c+ CMH-II+ dans la rate (Hu et al., 2007). Ainsi, ce type cellulaire apparaît comme un acteur important dans le développement du T1D et une cible privilégiée pour l'étude des mécanismes induit par HO-1 et le CO sur les réponses immunitaires.

Nous avons donc développé un mode de traitement des DCs au CO gaz. Précédemment, nous avons montré que les DCs traitées au CO par le CORM et maturées au LPS ont un ratio IL-12/IL-10 réduit et une perte de leur immunogénicité envers les cellules T CD8+ *in vivo* chez la souris (Annexe 1 : (Remy et al., 2009)). Nous avons retrouvé, pour les DCs traitées au CO gaz le même profil de sécrétion cytokinique et la même perte de leur capacité immunogène *in vivo*. En effet, dans notre modèle de T1D induit par les DCs, après injection de cellules T CD8+ anti-HA₅₁₂₋₅₂₀, l'immunisation des souris ins-HA par les DCs traitées au CO gaz, maturées au LPS et chargées avec le peptide HA₅₁₂₋₅₂₀ les protège du développement de la maladie. Même si dans notre modèle de T1D, le compartiment lymphoïde, où se déroule la présentation antigénique par les DCs n'a pas été étudié, il est important de préciser que l'injection de BMDCs par intraveineuse, notamment chez la souris NOD, conduit à l'accumulation de celles-ci majoritairement au niveau de la rate et des ganglions pancréatiques (Creusot et al., 2009). Ces résultats appuient l'idée qu'HO-1, par la production du CO, inhibe l'immunogénicité des DCs induite par l'activation des TLRs

(Annexe 1 : (Remy et al., 2009)) et suggèrent que les DCs traitées au CO gaz ont une fonction tolérogène.

Le pouvoir tolérogène des DCs traitées au CO gaz a donc été testé dans les souris NOD, qui développent spontanément le T1D. Nous avons montré qu'une seule injection de DCs traitées au CO gaz *in vitro*, chargées avec le peptide InsB₁₅₋₂₃ et maturées au LPS est suffisante pour réduire significativement l'incidence du diabète spontané. La destruction des cellules β est également diminuée par réduction de la pathogénicité des cellules T CD8+ autoréactives naturelles. En effet, le transfert de splénocytes, issus des souris immunisées avec les DCs traitées au CO gaz, dans les souris NOD-SCID, induit une plus faible incidence du diabète en comparaison du transfert de splénocytes issus des souris immunisées avec les DCs non traitées. Ce phénomène pourrait expliquer en partie les effets protecteurs d'HO-1 ou du CO observés dans des études précédentes quand les souris NOD sont traitées par des inducteurs d'HO-1 ou par inhalation du CO (Li et al., 2007b; Hu et al., 2007), mais dans lesquelles, comme je l'ai déjà évoqué, nous ne pouvons pas exclure un effet d'HO-1 ou du CO sur les autres types cellulaires, telles que les cellules T, les macrophages, les cellules endothéliales ou les cellules β elles-mêmes.

Le modèle murin de T1D induit par les DCs nous a permis de focaliser notre étude sur les cellules T CD8+ autoréactives dont le rôle pathogénique dans la destruction des cellules β a pris une place fondamentale, notamment chez la NOD et qui contribuent au maintien de l'inflammation des îlots pancréatiques (Tsai et al., 2008). De plus, les effets du CO sur l'activation des cellules T CD8+ sont très peu connus, contrairement à celui sur les cellules T CD4+, où il a été montré que le CO et HO-1 agissent sur les réponses CD4+ *via* les DCs (Biburger et al., 2009). Nous avons montré que les DCs traitées au CO gaz n'ont pas d'effet *in vitro* et *in vivo* sur les fonctions des cellules T CD8+. En effet, les cellules T CD8+ gardent leur capacité à proliférer, à sécréter l'IFN γ et à induire la lyse cytotoxique des cellules cibles. Par contre, l'activation, par les DCs traitées au CO gaz, des cellules T CD8+ autoréactives induit une perte de leur capacité de migration vers le pancréas. De façon intéressante, cette inhibition de la migration des cellules T CD8+ avait déjà été observée dans le pancréas après induction systémique de l'expression HO-1 pharmacologiquement chez la souris NOD (Li et al., 2007b). Ceci est en contradiction avec une autre étude qui montre que la production d'IL-12 par les DCs influence la production d'IFN γ par les cellules T CD8+, mais aussi la durée de l'interaction entre la DC et la cellule T. Cet effet est lié à la sécrétion par les DCs de CCL1 et de CCL17, qui favorise une interaction plus stable entre la DC et la cellule T (Henry et al., 2008). Cela dit, dans le cadre d'une étude portant sur un modèle d'allogreffe aortique, aucune modification de l'activation et de la prolifération de cellules T induites *in vitro* par des DCs traitées à l'hémine (pour induire l'expression d'HO-1) n'a été observée. De plus, cette étude montre une réduction de l'infiltration des cellules T dans les aortes de

donneur exprimant HO-1 mais les proportions de cellules T produisant l'IFN γ dans les ganglions lymphatiques régionaux sont similaires après une allogreffe aortique exprimant HO-1 ou non (Clarke et al., 2009). Cette étude appuie donc nos résultats et les différences observées avec l'étude précédente pourraient être expliquées par le fait qu'ils utilisent des DCs déficientes pour l'IL-12. Malgré tout, l'analyse de la durée d'interaction entre les DCs traitées au CO et les cellules T CD8+ pourrait fournir un élément de compréhension pour expliquer que les cellules T CD8+ induit par les DC traitées au CO migrent moins efficacement vers le pancréas. L'analyse des interactions DC-T et de la synapse immunologique sera réalisée *in vitro* en time lapse et microscopie confocale, notamment en collaboration avec l'équipe chilienne d'Alexis Kalergis, qui a une expertise confirmée dans ce genre d'expériences. Nous avons commencé l'étude du flux calcique dans les cellules OTI mises en co-culture avec des DCs sur-exprimant HO-1 ou non et incubées avec la protéine OVA. Les résultats montrent une inhibition partielle du flux calcique dans les OTI cultivées en présence de DCs surexprimant HO-1 et restent à confirmer avec des DCs traitées au CO.

Le défaut de migration des cellules T CD8+ autoréactives induit une baisse de l'inflammation au niveau du pancréas. Chez la NOD, il a récemment été mis en évidence une boucle d'amplification de la réponse autoimmune induite par la maturation des DCs intra-pancréatiques (Melli et al., 2009). En effet, l'inflammation intra-pancréatique médiée par les cellules T induit une augmentation de l'expression des marqueurs CD80 et CD40, ainsi qu'un apprêtement accru des antigènes capturés par les DCs résidentes du pancréas. De plus, une partie des DCs résidentes exprimant fortement le CD40, surrégulant le récepteur à chimiokine CCR7 (responsable de la migration vers les organes lymphoïdes) et portant des antigènes des îlots pancréatiques est retrouvée au niveau des ganglions pancréatiques. Ainsi, ces résultats suggèrent qu'une boucle d'amplification durant la progression du diabète auto-immun, dans laquelle l'infiltration initiale des cellules T conduit à une rapide maturation des DCs intra-pancréatiques, à leur migration au niveau des ganglions lymphatiques et à une activation plus importante des cellules T autoréactives (Melli et al., 2009). Une telle boucle d'amplification pourrait se produire dans notre modèle de T1D induit par les DCs, lorsque les souris sont immunisées par les DCs non traitées au CO gaz. Au contraire, l'immunisation des souris par les DCs traitées au CO gaz induit une inflammation moindre du pancréas par un défaut de migration des cellules T CD8+ autoréactives conduisant à une faible activation des DCs intra-pancréatiques et à une préservation des cellules β pancréatiques (conduisant à un faible relarguage des antigènes HA dans l'environnement pancréatique). Ainsi, peu ou pas de DCs intra-pancréatiques ne migrent vers les ganglions pancréatiques pour amplifier l'activation des cellules T CD8+ autoréactives (pourtant présentes dans les ganglions pancréatiques 10 jours après l'immunisation des souris et à

des taux similaires aux souris contrôles) et les souris sont protégées du développement du diabète auto-immun.

Nous avons également évalué les réponses secondaires des cellules T CD8+ autoréactives. Le challenge des cellules T CD8+ autoréactives dans les souris immunisées par les DCs traitées au CO gaz a été réalisé soit par une seconde injection de DC immunogènes (LPS + peptide HA₅₁₂₋₅₂₀), soit par injection du virus de l'influenza. Malgré ce challenge, les souris ne développent pas le diabète. Ces résultats sont en concordance avec une précédente étude qui a montré que l'absence de sécrétion de l'IL-12 par les DCs durant l'activation primaire des cellules T CD8+ (comme c'est le cas pour les DCs traitées au CO gaz) conduit à une réponse secondaire de ces mêmes cellules déficiente (Ye et al., 2008). De plus, les souris immunisées avec des DCs traitées au CO gaz montrent une résistance plus importante au diabète après challenge avec des cellules T CD8+ autoréactives cytotoxiques, ce qui suggère l'émergence d'une fonction T régulatrice. De telles fonctions régulatrices ont été mises en évidence dans d'autres modèles cellulaires, où les DCs traitées avec la trichosanthine, une substance suppressive végétale, montrent un profil de sécrétion de cytokine similaire aux DCs traitées au CO gaz (faible production d'IL-12 et augmentation de la sécrétion de l'IL-10) et sont impliquées dans l'activité suppressive de cellules Tregs CD8+ (Wang et al., 2010). En effet, dans notre modèle, une des possibilités est qu'une partie des cellules T CD8+ activées par les DCs traitées au CO gaz perdent leurs fonctions effectrices et gagnent des fonctions T régulatrices. Une façon de vérifier cette hypothèse serait de transférer des cellules T CD8+ autoréactives primaires activées par des DCs traitées au CO gaz chez la NOD ou dans notre modèle de diabète. Une autre possibilité serait l'amplification d'une population T CD4+ régulatrice par les DCs traitées CO gaz qui contrerait la réponse T CD8+ pathogénique. D'autant plus que récemment, il a été montré que le CO ou HO-1 agissent indirectement *via* les DCs sur les réponses des cellules T CD4+ (Biburger et al., 2009; Blancou et Anegon, 2010). Cela dit, nous montrons que la déplétion des cellules CD25+ ne modifie pas l'effet des DC traitées au CO gaz dans le modèle de diabète induit.

→ Les perspectives

1/ La migration des cellules T CD8+ autoréactives.

Nous avons vu que les cellules T CD8+ autoréactives activées par les DCs traitées au CO montrent un défaut de migration vers le pancréas. Les mécanismes exacts expliquant ce défaut sont encore à déterminer. L'adressage des cellules T vers les différents tissus peut être séparé en 3 temps : l'adhésion initiale et le roulement sur les cellules endothéliales, l'adhésion ferme et l'arrêt de la cellule, puis la diapédèse.

Chez la NOD, il semble que les interactions adhésives CMH-TCR soit à la base de l'adhésion initiale des cellules T CD8+ anti-InsB₁₅₋₂₃ à l'endothélium pancréatique. En effet, les cellules endothéliales des îlots pancréatiques ont l'unique capacité de cross-présenter des antigènes pancréatiques. L'adhérence des cellules T CD8+ anti-InsB₁₅₋₂₃ aux cellules endothéliales *in vitro* est directement liée à la disponibilité des complexes CMH-peptides. Ce phénomène facilite le transport des cellules T CD8+ diabéto-gènes vers les îlots pancréatiques (Savinov et al., 2003). Un tel phénomène pourrait se produire dans notre modèle de diabète induit dans les souris immunisées avec les DCs non traitées au CO. En effet, l'augmentation de l'insulite au niveau du pancréas et la destruction des cellules β permet la libération des antigènes, notamment des antigènes HA. La capture de ces antigènes par les cellules endothéliales du pancréas pourrait faciliter la migration des cellules T autoréactives vers le pancréas et amplifier la progression du diabète. Les souris immunisées avec les DCs traitées au CO gaz présentent une insulite moins élevée, ainsi la présentation des antigènes HA par les cellules endothéliales est moindre et contribue à un recrutement plus faible des cellules T CD8+ autoréactives, limitant la progression du diabète. Ainsi, il serait intéressant de réaliser des expériences de microscopie biphotonique au niveau du pancréas pour analyser des interactions entre les cellules T CD8+ et les cellules endothéliales, mais aussi la migration de ces cellules dans le tissu et les îlots pancréatiques.

L'adhésion ferme à l'endothélium pancréatique est liée à l'activation d'au moins une des trois intégrines suivantes : $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4), $\alpha_4\beta_7$ (LPAM-1) et LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$). Nous avons analysé l'expression de VLA-4 (forme activée ou non activée) et LPAM-1 sur les cellules T CD8+ autoréactives dans le modèle de diabète induit par les DCs. Aucune différence d'expression de ces intégrines entre les cellules T CD8+ autoréactives issues des 2 groupes (souris immunisées avec les DCs traitées au CO gaz ou non) n'a été observée. Nous n'avons pas encore testé l'expression de LFA-1 sur les T CD8+ autoréactifs. Bien qu'il ait été montré que le LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$) ne semble pas indispensable au développement du diabète (Hänninen et al., 2007), ces résultats sont maintenant controversés (Savinov et Burn, 2010). En effet, les souris NOD déficientes pour la chaîne β_2 (qui bloque complètement l'adhésion entre les cellules T et les cellules endothéliales) ou pour la chaîne α_L (qui affecte probablement l'activation des cellules T) ne développent ni l'insulite, ni le diabète (Glawe et al., 2009). L'expression de LFA-1 par les cellules T CD8+ autoréactives va donc être analysée, même si vraisemblablement il est peu probable de voir une différence, puisque les cellules T CD8+ sont activées normalement par les DCs traitées au CO gaz.

Plusieurs chimiokines et récepteurs aux chimiokines sont associés au développement du diabète. Dans le modèle de diabète induit par les DCs, nous avons regardé notamment l'expression par les cellules T CD8+ autoréactives du CCR5, qui a été impliqué indirectement

dans le développement du diabète *via* son ligand CCL3, entre les deux groupes de souris immunisées avec les DCs traitées au CO ou non traitées. Aucune différence d'expression n'a été constatée entre les 2 groupes, ce qui n'est pas étonnant puisque le CCR5 ne semble pas affecter la migration des cellules T diabétogènes. En effet, l'injection de cellules diabétogènes, issues d'animaux NOD déficients ou non pour le CCR5, dans des souris NOD-SCID induit une hyperglycémie dans les deux groupes, dans des cinétiques similaires. Le même résultat est obtenu obtenu pour le CCR2 (Solomon et al., 2010).

Un autre récepteur à chimiokines impliqués dans la migration des cellules T diabétogènes (Savinov et Burn, 2010), le CCR7 a été analysé pour son expression sur les cellules T CD8+ autoréactives issues les deux mêmes groupes de souris. Aucune différence n'a été constatée.

Cependant, l'axe chimiokine-récepteur CXCL10 (IP10)-CXCR3 pourrait être à l'origine du défaut de migration des cellules T CD8+ autoréactives dans notre modèle. Le récepteur CXCR3 et son ligand CXCL10 semble jouer un rôle important dans la pathogénèse du diabète. En effet, dans un modèle murin de diabète auto-immun induit par le virus lymphocytaire de choriomeningitis, l'absence d'expression du CXCR3 retarde le début de l'insulite et du diabète et le blocage du CXCL10 (mais pas du CXCL9, un autre ligand du CXCR3) empêche le développement du diabète après l'infection par le virus (Frigerio et al., 2002). Dans notre modèle, nous constatons que les cellules T CD8+ autoréactives expriment plus faiblement le CXCR3. Cela dit, ces résultats restent à confirmer. Il serait donc intéressant d'analyser l'expression de son ligand le CXCL10 au niveau du pancréas, car les cellules β du pancréas expriment le CXCL10 lors de l'inflammation. Une question se pose : si l'expression du CXCL10 est diminuée au niveau du pancréas du fait d'une inflammation moindre, le défaut de migration des cellules T CD8+ autoréactives est-il la cause ou la conséquence de cette production de CXCL10, autrement est-ce que le défaut d'inflammation qui induit le défaut de migration chez les souris immunisées avec les DCs traitées au CO gaz ? Pour répondre à cette question, nous allons étudier la migration des cellules T CD8+ Thy1.1, issues des animaux immunisées par des DCs traitées au CO ou des DCs non traitées puis ré-injectées dans des souris NOD.SCID, dans lesquelles une inflammation sera préalablement déclenchée par l'injection de cellules T CD8+ cytotoxiques issues de souris NOD diabétiques.

Il serait également intéressant de comparer les niveaux d'expression du CXCL10 par les cellules T CD8+ autoréactives entre les deux groupes de souris. En effet, chez la NOD, il a été montré que les cellules T CD8+ anti-InsB₁₅₋₂₃ expriment de plus fortes quantités de CXCL10, que d'autres cellules T diabétogéniques, et que cette expression détermine leur fort pouvoir diabétogène et leur adressage vers les îlots pancréatiques (Ejrnaes et al., 2005) Ainsi, les souris immunisée par les DCs traitées au CO pourraient activer des cellules T

CD8+ autoréactives produisant moins de CXCL10 que celle activées pas les DCs non traitées au CO gaz.

D'autre part, le modèle NOD reste également à être étudié en détail. En effet, il faudrait vérifier si ce défaut de migration des cellules T CD8+ autoréactives, notamment des T CD8+ anti-InsB₁₅₋₂₃ est retrouvé chez la NOD immunisée avec des DCs traitées au CO gaz en capturant *via* des tétramères les cellules T CD8+ autoréactives induites, ce qui permettrait de caractériser leur phénotype et leurs fonctions, notamment après restimulation antigénique.

Enfin, une autre hypothèse pourrait être également testée. L'adhésion ferme des lymphocytes T avec le tissu endothélial est médiée par le CD44. Le CD44 est le principal récepteur de l'acide hyaluronique (AH) qui est exprimé abondamment sur les cellules endothéliales et dans la matrice extracellulaire. Les interactions CD44-AH sont requises pour l'extravasation d'une large variété de cellules T pathogéniques. En effet, la migration des cellules T médiée par le CD44 a été associée avec l'arthrite humaine, l'arthrite murine induite par le collagène et dans un modèle murin de sclérose en plaque. De plus, la neutralisation du CD44 chez la NOD protège les souris du développement du T1D spontané. Nous avons montré que dans notre modèle de diabète induit par les DCs, les cellules T CD8+ autoréactives expriment le même niveau de CD44 entre les souris résistantes au diabète et les souris développant le diabète. Ainsi, l'interaction CD44-AH ne peut pas expliquer le défaut de migration des cellules T pathogéniques. Cela dit, la différence de migration des cellules T CD8+ autoréactives pourrait être liée au relargage du CD44 lors de la diapédèse à travers les parois des capillaires sanguins. Ce relargage du CD44 est médié par une métalloprotéinase, la MT1-MMP associée à la membrane cellulaire. La MT1-MMP est notamment responsable du relargage du CD44 des cellules T CD8+ anti-InsB₁₅₋₂₃ chez la NOD. La MT1-MMP devient active uniquement dans les cellules T diabétogènes adhérentes. La protéolyse par la MT1-MMP du CD44 semble contrôler la sévérité du diabète et permet la transition entre l'adhésion des cellules T sur l'endothélium et la migration transendothéliale, précédant l'adressage des cellules T vers les îlots pancréatiques. De plus, l'inhibition de la protéolyse du CD44 médiée par la MT1-MMP prolonge l'adhésion des cellules T CD8+ anti-InsB₁₅₋₂₃ sur l'endothélium vasculaire, diminue l'efficacité de la migration intra-pancréatique et retarde significativement l'apparition du diabète induit par les cellules T CD8+ anti-InsB₁₅₋₂₃ ou les splénocytes totaux diabétogènes (Savinov et al., 2005, 2006, 2007; Savinov et Strongin, 2007). Dans notre modèle de diabète induit par les DCs, il serait intéressant d'analyser *in vitro* après adhésion des cellules sur de la gélatine (pour activer la MT1-MMP), si le relargage du CD44 par les cellules T CD8+ auto-réactives, issues des souris immunisées par les DCs traitées au CO gaz, est diminué en comparaison de celui de

cellules T CD8+ auto-réactives issues des souris immunisées par les DCs non traitées au CO. Une différence dans le relargage du CD44 pourrait expliquer le défaut de migration des cellules T CD8+ autoréactives par une adhésion maintenue sur l'endothélium et un défaut de transmigration vers les îlots pancréatiques.

2/ Les cellules T régulatrices

Bien que les cellules T régulatrices CD25+ ne semblent pas impliquées dans l'effet observé par l'injection de DCs traitées au CO dans le modèle de diabète induit par les DCs, la possibilité la plus probable pour expliquer l'apparition de fonctions régulatrices suggérées par les expériences de challenge avec des cellules T cytotoxiques est que les cellules T CD8+ autoréactives activées par les DCs traitées au CO gaz gagnent des fonctions régulatrices. Nous avons testé la production du CCL3 par les cellules T CD8+ autoréactives en pensant que cela pourrait expliquer la différence d'inflammation au niveau du pancréas entre les 2 groupes de souris. Une autre chimiokine semble intéressante à étudier : le CCL4. En effet, chez l'homme, une population de Tregs CD8+ LAG3+ a été identifiée à partir de cellules mononucléaires du sang de donneur sain après restimulation antigénique (Joosten et al., 2007). Cette population de Tregs induite supprime l'activation des cellules T par la sécrétion du CCL4. Bien que ce phénomène ne soit pas relié à la migration des cellules T, il serait intéressant d'analyser la sécrétion du CCL4 par les cellules T CD8+ autoréactives issues des groupes de souris résistantes ou non au diabète avant et après restimulation antigénique. D'autre part, le fait que le CCL4 soit une molécule effectrice sécrétée par les Tregs pourrait être un élément explicatif dans le fait que les souris NOD déficientes pour le CCR5 montrent une accélération dans le développement du diabète avec un insulite agressive et une migration altérée des leucocytes dans les îlots pancréatiques, puisque le CCR5 est l'unique récepteur du CCL4.

Enfin, le développement de cellules régulatrices après immunisation avec des DCs traitées au CO gaz devra être analysé dans le cadre des souris NOD. En effet, les souris NOD développent des cellules T pathogéniques ou régulatrices spécifiques des antigènes des îlots pancréatiques. De plus, chez la NOD, le couplage d'autoantigènes sur des CPAs (Fife et al., 2006) ou le chargement peptidique de ces autoantigènes sur des DCs tolérogènes (Lo et al., 2006) répriment l'autoimmunité envers les cellules β pancréatiques en induisant une tolérance par délétion et/ou l'anergie des cellules T autoréactives ou en générant des cellules T régulatrices spécifiques de l'antigène. Ainsi, les DCs traitées au CO pourraient donc induire des cellules Tregs CD4+ dans le contexte NOD, ce qui ne se passe probablement pas dans le modèle de diabète induit. Dans le modèle NOD, il serait donc intéressant de faire une analyse des différentes populations T CD8+ ou CD4+ spécifiques

des autoantigènes induites par l'immunisation par les DCs traitées au CO à l'aide de tétramères. Notamment, une population CD4⁺CD62L⁺, qui joue un rôle clé dans le contrôle du diabète (You et al., 2004; Alyanakian et al., 2003), pourrait être induite après l'immunisation avec les DCs traitées au CO gaz.

De plus, d'autres peptides diabétogènes comme IGRP₂₀₆₋₂₁₄ pourraient être testés pour comparer l'efficacité de la protection induite par les DCs traitées au CO suivant le peptide utilisé et améliorer la capacité d'immunothérapie induite par les DCs traitées au CO gaz. Notamment, il a été montré que l'injection de forte dose de peptides de faible affinité, tels que NRP-V7, un mimotope d'IGRP qui possède 67% d'homologie avec le peptide endogène IGRP₂₀₆₋₂₁₄, permet de cibler les cellules T CD8⁺ diabétogènes et l'expansion de clonotypes CD8⁺ non pathogéniques de faible avidité qui bloquent l'accès des cellules β pancréatiques aux clonotypes pathogéniques (Tsai et al., 2008). De plus, l'injection de nanoparticules couplées à des complexes CMH-NRP-V7 chez la NOD induit la génération de cellules T CD8⁺ autorégulatrices issues de la conversion de cellules T CD8⁺ autoréactives de faible affinité (Tsai et al., 2010). Il serait intéressant de se servir de ces peptides de faible affinité en les chargeant sur des DCs non traitées au CO pour expandre les clonotypes de faible avidité non pathogéniques et induire des cellules T CD8⁺ autorégulatrices et en parallèle de charger les DCs traitées au CO avec les peptides de fortes affinités pour induire une réponse tolérogène et diminuer la réponse pathogénique des clonotypes de forte avidité.

→ Conclusions générales

La Figure 40 propose un schéma récapitulatif des mécanismes induits par l'immunisation des souris ins-HA par des DCs traitées au LPS et chargées avec le peptide HA. L'injection de DCs traitées au LPS et chargées avec le peptide HA en intraveineuse permet une accumulation des DCs dans la rate et les ganglions pancréatiques. Cette injection permet l'activation des cellules T CD8⁺ autoréactives injectées le jour précédent. Cette activation permet la migration des cellules T CD8⁺ autoréactives dans le pancréas (Figure 40 – 1). Une fois dans le pancréas, les cellules T CD8⁺ autoréactives détruisent les cellules β , vraisemblablement *via* la sécrétion d'IFN γ , de granzymes et de perforine (Figure 40 – 2). Cette destruction des cellules β induit le relarguage d'autoantigènes dans l'environnement des îlots pancréatiques et favorisent l'inflammation médiée par l'infiltration des îlots par probablement les cellules NK et les macrophages (Figure 40 – 3). Cette infiltration des cellules NK et des macrophages renforcent vraisemblablement la destruction des cellules β *via* la sécrétion de TNF α et d'IL-1 β . Les antigènes relargués par la destruction des cellules β pourraient être capturés par les DCs intra-pancréatiques, qui dans le contexte de l'inflammation pourraient en retour maturer et migrer vers les ganglions pancréatiques

pour amplifier la réponse des cellules T CD8+ pathogéniques (Figure 40 – 4 et 5). Cette boucle d'amplification aggrave la destruction des cellules β pancréatiques et se traduit par le développement du diabète auto-immun. Un axe chimiokine-récepteur à chimiokine est vraisemblablement impliqué dans cette migration : l'axe CXCR3-CXCL10.

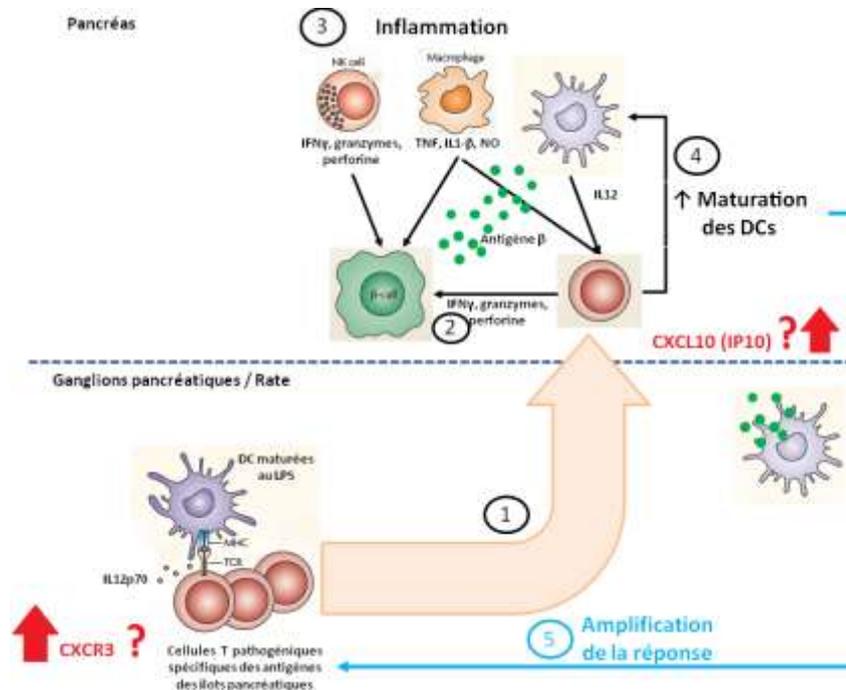


Figure 40. Schéma récapitulatif de l'induction du diabète par les DCs dans le modèle murin Ins-HA.

Adapté de Lehen et al, Nature Immunol. Review, 2010.

La Figure 41 propose un schéma récapitulatif des possibles mécanismes induit par l'activation des cellules T CD8+ autoréactives par les DCs traitées au CO gaz. Comme précédemment l'activation des cellules T CD8+ autoréactives se produit vraisemblablement dans les ganglions pancréatiques et dans la rate. Cette activation réalisée sans la présence d'IL-12 conduit pourtant à l'obtention de cellules T autoréactives fonctionnellement identiques aux cellules T CD8+ autoréactives induites par les DCs non traitées au CO gaz (même capacité de lyse cytotoxique, de sécrétion cytokinique et de prolifération). Pourtant, peu de cellules T CD8+ autoréactives migrent vers le pancréas et une préservation des cellules β du pancréas est observée (Figure 41-1 et 2). Cette préservation des cellules β induit peu d'inflammation au niveau des îlots pancréatiques, ce qui pourrait vraisemblablement empêcher la boucle d'amplification de la réponse des cellules T CD8+ autoréactives pathogéniques de s'installer (Figure 41-3). Ainsi le développement du diabète ne se produit pas. La question d'une probable implication de cellules T régulatrices est à résoudre, bien que la déplétion des cellules CD25+ ne modifie pas ce schéma. Vraisemblablement, si une induction de cellules T régulatrices est impliquée dans ce

phénomène, un phénotype CD8+ régulateur est présent, comme il a été démontré dans un modèle de tolérance de greffe cardiaque, induite par le CD40-Ig (Li et al., 2010). Plusieurs questions sur l'origine de cette différence de migration restent à résoudre : l'axe CXCR3-CXCL10 est-il la cause de ce phénomène, la baisse de la migration de ces cellules T CD8+ autoréactives est-elle une cause ou une conséquence du peu d'inflammation observée dans les îlots pancréatiques et cette migration est-elle spécifique de l'organe ? L'inflammation d'un autre organe, tel que les poumons, par exemple, avec le virus de l'influenza permettrait d'analyser la migration des cellules T autoréactives activées par des DCs traitées ou non au CO et de répondre à cette dernière question.

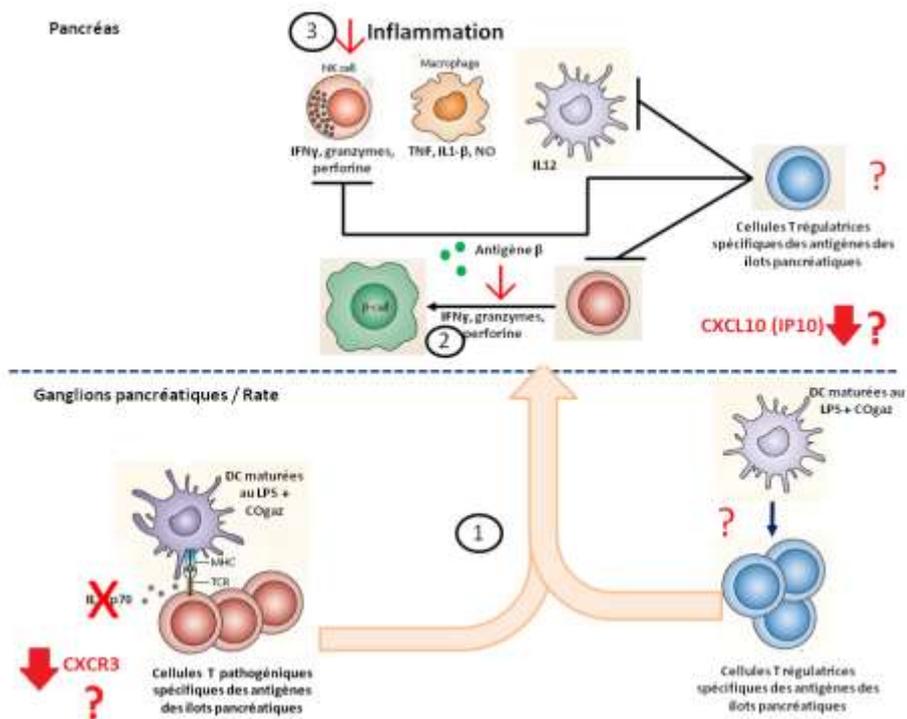


Figure 41. Schéma récapitulatif de la protection contre le développement du diabète par les DCs traitées au CO gaz dans le modèle murin Ins-HA
Adapté de Lehuen et al, Nature Immunol. Review, 2010.

Pour conclure sur cette partie, il serait intéressant d'analyser l'effet du CO et/ou d'HO-1 sur les cellules NK et les cellules B, qui interviennent également dans le T1D et l'inflammation, puisque peu ou pas de données concernant l'effet du CO ou d'HO-1 sur ces deux types cellulaires ne sont disponibles à l'heure actuelle. Ces cellules pourraient intervenir dans le contrôle de l'inflammation par HO-1 ou le CO aux cotés des DCs.

II- HO-1/CO : Impact sur la cross-présentation par les DCs

Une deuxième partie de mon travail a concerné l'étude du CO ou d'HO-1 sur le phénomène de cross-présentation réalisée par les DCs. L'induction d'HO-1 et le traitement au CO des DCs traitées au LPS et incubées avec la protéine OVA réduit significativement l'activation des cellules OT-I spécifiques du peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄. A l'inverse, l'activation des cellules OT-I par les DCs chargées avec le peptide SIINFEKL OVA₂₅₇₋₂₆₄ n'est pas modifiée que les DCs soient traitées ou non pour l'induction d'HO-1 ou au CO. Ceci suggère un effet d'HO-1 ou du CO sur les mécanismes intracellulaires de cross-présentation des DCs.

Nous avons tout d'abord vérifié si les mécanismes de capture antigénique étaient impliqués dans cette inhibition de l'activation des cellules OT-I, comme il a déjà été montré pour d'autres molécules immunosuppressives telles que la rapamycine ou la sanghiferine A (Hackstein et Thomson, 2004). Ni les capacités de phagocytose, ni celles d'endocytose médiée par les récepteurs des DCs ne sont affectées par l'induction d'HO-1, ni par le traitement au CO.

Ainsi, nous avons analysé les mécanismes d'apprêtement antigénique. Pour prouver un éventuel défaut dans le chargement peptidique sur les molécules de classe I, nous avons voulu quantifier les complexes CMH-I-peptide présents en surface cellulaire, après induction d'HO-1 ou traitement au CO des DCs. Le manque de sensibilité de l'anticorps 25D116, spécifique des complexes CMH-I-OVA₂₅₇₋₂₆₄, ne nous a pas permis de répondre à cette question, tout du moins avec des techniques de cytométrie en flux. Nous allons donc tenté de répondre à cette question par l'utilisation de cet anticorps en microscopie confocale, puisqu'il semble mieux fonctionner par cette méthode (Burgdorf et al., 2008).

Les mécanismes de dégradation ont également été étudiés par deux techniques différentes : le DQ-OVA, qui permet l'étude de la dégradation dans les endosomes et les billes couplées de façon covalente à la protéine OVA, qui permet l'étude de la dégradation antigénique dans les phagosomes. Nous n'avons noté aucune différence dans le profil de dégradation après endocytose du DQ-OVA entre les DCs sur-exprimant HO-1 ou traitées au CO. En ce qui concerne la capacité de dégradation antigénique après phagocytose des billes-OVA, l'induction d'HO-1 dans les DCs et le traitement au CO des DCs montrent une légère augmentation de la protéolyse à 30min, au cours du temps les capacités de dégradation des DCs traitées au CO ou sur-exprimant HO-1 sont similaires aux conditions contrôles. Puisque la dégradation de l'ovalbumine à 30min est très faible dans les conditions contrôles voire quasi inexistante (si l'on se réfère au bruit de fond obtenu au temps 0min), peut-on considérer le temps 30min comme un temps approprié pour l'étude de la capacité de

dégradation ? Pourtant, l'étude de la cinétique de relargage des antigènes dans le cytosol après phagocytose de levures par les DCs a montré que les antigènes doivent être relargués dans le cytosol dans une fenêtre de temps d'environ 25min après la phagocytose pour permettre une cross-présentation efficace (Howland et Wittrup, 2008). Or, ce temps correspond dans nos expériences au temps où la dégradation antigénique dans les phagosomes est très faible. Cela dit, ces résultats ne sont pas en adéquation avec l'étude de l'acidification des phagosomes réalisée avec des billes-OVA qui montre que les phagosomes dans les DCs murines ne s'acidifient pas pendant 3h (Savina et al., 2006). La connection entre l'acidification du phagosome et l'acquisition de l'activité protéolytique ne sont pas encore clairs et comment ces 2 paramètres peuvent être affectés par l'état de la DCs et la nature de la particule antigénique utilisée est encore à éclaircir. Nous avons donc favorisés les temps 1h et 2h pour l'étude des mécanismes de dégradation pour s'assurer que ce que l'on analyse n'est pas un artéfact. Ainsi, nous concluons que les mécanismes de dégradation dans le phagosome ne sont pas affectés par l'induction d'HO-1 ou le traitement au CO. Parallèlement, nous nous sommes intéressés à l'interaction de la NADPHoxydase avec HO-1 et le CO. La NADPHoxydase contrôle le pH phagosomal dans les DCs (Savina et al., 2006), ce qui régule la dégradation antigénique, comme nous venons de l'évoquer. La NADPHoxydase possède une sous-unité, la gp91^{phox} (NOX2) qui contient deux hèmes. Par ailleurs, il a déjà été montré chez le macrophage que HO-1 et le CO pouvait interagir avec la NOX2 et inhiber la production des réactifs oxygénés par celle-ci (Nakahira et al., 2006; Taille et al., 2004, 2005). Nous avons précédemment montré que dans les DCs humaines, l'induction d'HO-1 inhibe la production des réactifs oxygénés (Chauveau et al., 2005). Nous avons donc analysé l'expression de la gp91^{phox} dans les DCs de souris après induction d'HO-1 et le traitement au CO. Aucune différence d'expression de la gp91^{phox} n'est constatée entre les différentes conditions. Ces résultats sont en contradiction avec une précédente étude qui avait montré que l'expression de la gp91^{phox} est fortement augmentée lors de la maturation par le LPS dans les DCs humaines (Vulcano et al., 2004). Cela dit, nous avons également relevé des différences d'expression d'HO-1 entre les DCs humaines et les DCs murines (non montré). En effet, nous avons montré que la maturation par le LPS des DCs humaines inhibe l'expression d'HO-1 dans celles-ci (Annexe 1 : (Remy et al., 2009)), or dans les DCs murines, nous n'avons jamais retrouvé cette inhibition de l'expression d'HO-1 induit par le LPS. Ces différences d'expression d'HO-1 suite à la stimulation au LPS entre les DCs humaines et les DCs murines pourraient être liées aux conditions de culture des DCs, comme il a été récemment observé. En effet, il a été montré que suivant les conditions utilisées pour la culture des DCs chez la souris, l'expression d'HO-1 varie après la stimulation au LPS. Ainsi, lorsque la culture de DCs est réalisée en présence de GM-CSF, on observe un pic de l'expression d'HO-1 après 16h de stimulation au LPS et une expression

d'HO-1 maintenue à 24h (Park et al., 2010). Cette situation est similaire à ce que nous obtenons avec les DCs murines que nous cultivons en GM-CSF uniquement. Cela dit, quand les DCs murines sont cultivées en présence de GM-CSF et d'IL-4, comme c'est le cas pour les DCs humaines, on observe une expression d'HO-1 fortement inhibée après 24h de maturation au LPS, similairement à ce que l'on trouve pour les DCs humaines. C'est pourquoi, nous allons d'avantage investir l'analyse de l'interaction entre la NADPHoxydase et HO-1/CO, notamment par l'analyse de la production des réactifs oxygénés par les DCs et l'analyse de la fixation du CO sur le cytochrome b558, composé de la sous-unité gp91^{phox} et p22^{phox}. Cela dit, comme HO-1 et le CO ne semblent pas influencer la dégradation antigénique, il est probable que même si HO-1 ou le CO interagissent avec la NOX2, ce phénomène ne soit pas la raison de l'inhibition de la cross-présentation observée dans les DCs.

Puisque les mécanismes de dégradation antigénique ne semblent pas responsables de l'inhibition de la cross-présentation observée par l'induction d'HO-1 ou le traitement au CO gaz des DCs, nous allons étudier d'autres voies impliquées dans les mécanismes de cross-présentation, comme la sortie des antigènes vers le cytosol de la voie phagosome-cytosol-phagosome. En effet, HO-1 ou le CO pourrait jouer un rôle sur la sortie des antigènes dans le cytosol. Plusieurs pistes sont à explorer. En effet, comme je l'ai décrit en introduction, les corps gras présents dans les DCs ont un rôle dans l'efficacité de la cross-présentation par les DCs, leur présence étant nécessaire pour la cross-présentation des antigènes (Bougnères et al., 2009). Une interaction entre les phagosomes et les corps gras est observée et il semblerait que cette interaction permet la fuite des peptides dans le cytosol par déstabilisation de la membrane du phagosome (Bougnères et al., 2009). Or, les corps gras contiennent la cavéoline-1 (Fujimoto et al., 2008) et nous avons vu que la cavéoline-1 et le CO interagissent, ce qui a pour effet de délocaliser le TLR4 dans les caveolae (Wang et al., 2009). D'autre part, le traitement au CORM des macrophages permet une augmentation de l'expression de la protéine PPAR γ ainsi qu'une augmentation de son activité (Tsoyi et al., 2009). Or, les DCs humaines activées par le PPAR γ présentent une plus faible quantité de corps gras dans leur cytoplasme (Szatmari et al., 2007). Ainsi, dans notre cas, on peut supposer que le traitement au CO des DCs murines pourrait augmenter l'expression et l'activation du PPAR γ , ce qui aboutirait à une diminution des corps gras au niveau du cytosol et pourrait expliquer un défaut du passage des antigènes dans le cytosol.

Une fois sortis dans le cytosol, les antigènes doivent revenir dans le phagosome pour être chargé sur les molécules du CMH-I. Ce mécanisme peut être dépendant des transporteurs TAP. Or, il a été montré que la stimulation au LPS engendre une délocalisation du TAP au niveau des endosomes (Burgdorf et al., 2008). Le CO et HO-1 interagissant avec

la signalisation du TLR4, il est possible que la délocalisation du TAP soit inhibée par le CO et HO-1, bloquant ainsi le chargement des peptides sur les molécules de classe I. Si, de tels mécanismes se produisent, il se pourrait que seule la cross-présentation soit affectée par le traitement au CO ou l'induction d'HO-1, puisque la sortie dans le cytosol ne concerne pas la voie de présentation sur les molécules de classe-II.

Enfin, nous nous sommes intéressés à l'effet d'HO-1 et du CO sur la survie et la présentation antigénique des bactéries *Salmonella Typhimurium*. Nous possédons une forme virulente 14028s et une forme atténuée Δ Spi-2 de la *Salmonella Typhimurium*. Nous montrons que la survie de la souche bactérienne atténuée Δ Spi-2 est augmentée à l'intérieur des DCs après traitement par le CO ou l'induction d'HO-1. Une précédente étude a montré que l'inhibition d'HO-1 pharmacologiquement et avec des si-RNA améliore la survie de la *Salmonella Typhimurium* dans le foie des souris infectées, les macrophages péritonéaux et les macrophages RAW264 (Zaki et al., 2009). Ceci est donc en contradiction avec nos résultats. La souche bactérienne de *Salmonella Typhimurium* utilisée dans les expériences de Zaki et al est différente, il s'agit de la souche LT2 avirulente, contrairement à la souche 14028s. Ces souches se sont séparées au cours de l'évolution et montrent peu de différences au niveau génomique (Jarvik et al., 2010). Les disparités dans le caractère virulent des souches LT2 et 14028s sont probablement dues à une régulation de l'expression des gènes différente entre les deux souches (Badie et al., 2007). De plus, le caractère avirulent de la souche LT2 est lié au fait qu'elle présente une déficience pour le gène RpoS (RNA polymérase σ , factor), impliqué dans la survie bactérienne en condition de stress. La souche LT2 est donc naturellement sensible au stress cellulaire (Swords et al., 1997). Or, l'expression d'HO-1 est induite en condition de stress. Le fait que la survie bactérienne de la souche LT2 soit augmentée par l'inhibition d'HO-1 est donc logique. Or, pour nos expériences nous avons utilisé la souche 14028s virulente et son homologue Δ Spi-2 atténué possédant un gène RpoS non déficient. La souche de *Salmonella Typhimurium* Δ Spi-2 est atténuée, car sa mutation permet de restorer la fusion phago-lysosomale et ainsi de dégrader la bactérie pour une présentation en surface sur les molécules du CMH-I et du CMH-II (Bueno et al., 2010, 2005; Tobar et al., 2006). Ainsi, il est possible qu'HO-1 ou le CO provoquent des effets différents sur la survie de cette souche atténuée, que ceux précédemment observés avec la souche LT2. D'autre part, l'étude porte sur des macrophages et les effets d'HO-1 et du CO sont connus pour être différents entre les macrophages et les DCs, notamment dans les voies de signalisation affectées par le CO ou HO-1. Ainsi, le fait qu'HO-1 et que le CO induisent une augmentation de la survie de la bactérie à l'intérieur des DCs pourrait avoir un lien avec une éventuelle inhibition de la dégradation de la bactérie par blocage de la fusion phago-lysosomale. Logiquement, la survie de la bactérie Δ Spi-2 étant améliorée par le CO ou HO-1, sa cross-présentation est

inhibée par ces mêmes traitements (ces résultats sont à confirmer). La présentation des antigènes aux cellules T CD4+ n'a pas encore été testé, mais il est fort probable que celle-ci soit également inhibée, du fait de l'augmentation de la survie bactérienne. Ainsi, dans le système bactérien, nous n'analysons vraisemblablement pas l'effet d'HO-1 et du CO sur le simple mécanisme de cross-présentation mais nous analysons un phénomène plus complexe impliquant la survie d'un organisme vivant à l'intérieur de la DCs, et qui peut donc expliquer pourquoi ces résultats sont différents de nos expériences de dégradation antigénique avec les billes-OVA, où nous observons que ni le CO, ni HO-1 n'altère les capacités des DCs à dégrader l'antigène après capture antigénique.

Pour prouver que HO-1 ou le CO ont un effet sur les fusions phagolysosomales, des expériences en microscopie confocale sont prévues après infection de DCs traitées au CO ou sur-exprimant HO-1 avec une souche de *Salmonella* virulente 14028s ou atténuée Δ Spi-2 exprimant la GFP. Par la réalisation de co-marquages avec les différents marqueurs des endosomes précoces, tardifs et des lysosomes nous pourrions répondre à cette question.

III-Conclusion

Ainsi, ce travail de thèse, notamment sur le T1D, renforce l'idée que la tolérance induite par le CO pourrait être une approche intéressante pour l'immunothérapie des maladies autoimmunes. Plusieurs étapes supplémentaires sont encore nécessaires à élucider avant d'éventuels essais, chez l'homme, de thérapies tolérogènes induite par le CO. Notamment, dans le cadre du diabète, l'identification des peptides du soi majoritairement reconnus par les cellules T pathogènes dans le T1D et les cinétiques de traitement sont à définir avec précision.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdalla, M. Y., Ahmad, I. M., Spitz, D. R., Schmidt, W. N., et Britigan, B. E. (2005). Hepatitis C virus-core and non structural proteins lead to different effects on cellular antioxidant defenses. *J Med Virol* 76, 489-97.
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., et Weissman, I. L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193-197.
- Akira, S., Uematsu, S., et Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.
- Albert, M. L., Jegathesan, M., et Darnell, R. B. (2001). Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells. *Nat. Immunol* 2, 1010-1017.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., et Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732-738.
- Allan, R. S., Smith, C. M., Belz, G. T., van Lint, A. L., Wakim, L. M., Heath, W. R., et Carbone, F. R. (2003). Epidermal viral immunity induced by CD8alpha+ dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science* 301, 1925-1928.
- Allan, R. S., Waithman, J., Bedoui, S., Jones, C. M., Villadangos, J. A., Zhan, Y., Lew, A. M., Shortman, K., Heath, W. R., et Carbone, F. R. (2006). Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming. *Immunity* 25, 153-162.
- Allenspach, E. J., Lemos, M. P., Porrett, P. M., Turka, L. A., et Laufer, T. M. (2008). Migratory and lymphoid-resident dendritic cells cooperate to efficiently prime naive CD4 T cells. *Immunity* 29, 795-806.
- Alvarez, D., Vollmann, E. H., et von Andrian, U. H. (2008). Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity* 29, 325-342.
- Alyanakian, M., You, S., Damotte, D., Gouarin, C., Esling, A., Garcia, C., Havouis, S., Chatenoud, L., et Bach, J. (2003). Diversity of regulatory CD4+T cells controlling distinct organ-specific autoimmune diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 100, 15806-15811.
- Amigorena, S., et Savina, A. (2010). Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol* 22, 109-117.
- Andersen, M. H., Sorensen, R. B., Brimnes, M. K., Svane, I. M., Becker, J. C., et thor Straten, P. (2009). Identification of heme oxygenase-1-specific regulatory CD8+ T cells in cancer patients. *J Clin Invest* 119, 2245-56.
- Anderson, G., Partington, K. M., et Jenkinson, E. J. (1998). Differential effects of peptide diversity and stromal cell type in positive and negative selection in the thymus. *J. Immunol* 161, 6599-6603.

- Andrew, D. P., Ruffing, N., Kim, C. H., Miao, W., Heath, H., Li, Y., Murphy, K., Campbell, J. J., Butcher, E. C., et Wu, L. (2001). C-C chemokine receptor 4 expression defines a major subset of circulating nonintestinal memory T cells of both Th1 and Th2 potential. *J. Immunol* 166, 103-111.
- Ansel, K. M., McHeyzer-Williams, L. J., Ngo, V. N., McHeyzer-Williams, M. G., et Cyster, J. G. (1999). In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines. *J. Exp. Med* 190, 1123-1134.
- Araujo, J. A., Meng, L., Tward, A. D., Hancock, W. W., Zhai, Y., Lee, A., Ishikawa, K., Iyer, S., Buelow, R., Busuttil, R. W., et al. (2003). Systemic rather than local heme oxygenase-1 overexpression improves cardiac allograft outcomes in a new transgenic mouse. *J Immunol* 171, 1572-80.
- Arbour, N. C., Lorenz, E., Schutte, B. C., Zabner, J., Kline, J. N., Jones, M., Frees, K., Watt, J. L., et Schwartz, D. A. (2000). TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 25, 187-91.
- Ardavin, C., Wu, L., Li, C. L., et Shortman, K. (1993). Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* 362, 761-763.
- Asselin-Paturel, C., Boonstra, A., Dalod, M., Durand, I., Yessaad, N., Dezutter-Dambuyant, C., Vicari, A., O'Garra, A., Biron, C., Brière, F., et al. (2001). Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat. Immunol* 2, 1144-1150.
- Autenrieth, S. E., et Autenrieth, I. B. (2009). Variable antigen uptake due to different expression of the macrophage mannose receptor by dendritic cells in various inbred mouse strains. *Immunology* 127, 523-529.
- Bachem, A., Güttler, S., Hartung, E., Ebstein, F., Schaefer, M., Tannert, A., Salama, A., Movassaghi, K., Opitz, C., Mages, H. W., et al. (2010). Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *J. Exp. Med* 207, 1273-1281.
- Badie, G., Heithoff, D. M., Sinsheimer, R. L., et Mahan, M. J. (2007). Altered levels of Salmonella DNA adenine methylase are associated with defects in gene expression, motility, flagellar synthesis, and bile resistance in the pathogenic strain 14028 but not in the laboratory strain LT2. *J. Bacteriol* 189, 1556-1564.
- Baldwin, T., Henri, S., Curtis, J., O'Keeffe, M., Vremec, D., Shortman, K., et Handman, E. (2004). Dendritic cell populations in Leishmania major-infected skin and draining lymph nodes. *Infect. Immun* 72, 1991-2001.
- Bamboate, Z. M., Stableford, J. A., Plitas, G., Burt, B. M., Nguyen, H. M., Welles, A. P., Gonen, M., Young, J. W., et DeMatteo, R. P. (2009). Human liver dendritic cells promote T cell hyporesponsiveness. *J. Immunol* 182, 1901-1911.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., et

- Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol* 18, 767-811.
- Banchereau, J., et Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
- Banchereau, J., et Palucka, A. K. (2005). Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat. Rev. Immunol* 5, 296-306.
- Becker, T., Zu Vilsendorf, A. M., Terbish, T., Klempnauer, J., et Jorns, A. (2007). Induction of heme oxygenase-1 improves the survival of pancreas grafts by prevention of pancreatitis after transplantation. *Transplantation* 84, 1644-55.
- Bedoui, S., Whitney, P. G., Waithman, J., Eidsmo, L., Wakim, L., Caminschi, I., Allan, R. S., Wojtasiak, M., Shortman, K., Carbone, F. R., et al. (2009). Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nat. Immunol* 10, 488-495.
- Belizaire, R., et Unanue, E. R. (2009). Targeting proteins to distinct subcellular compartments reveals unique requirements for MHC class I and II presentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 106, 17463-17468.
- Belladonna, M. L., Volpi, C., Bianchi, R., Vacca, C., Orabona, C., Pallotta, M. T., Boon, L., Gizzi, S., Fioretti, M. C., Grohmann, U., et al. (2008). Cutting edge: Autocrine TGF-beta sustains default tolerogenesis by IDO-competent dendritic cells. *J. Immunol* 181, 5194-5198.
- Bennett, C. L., van Rijn, E., Jung, S., Inaba, K., Steinman, R. M., Kapsenberg, M. L., et Clausen, B. E. (2005). Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity. *J. Cell Biol* 169, 569-576.
- Benoist, C., et Mathis, D. (1989). Positive selection of the T cell repertoire: where and when does it occur? *Cell* 58, 1027-1033.
- Berthier, R., Martinon-Ego, C., Laharie, A. M., et Marche, P. N. (2000). A two-step culture method starting with early growth factors permits enhanced production of functional dendritic cells from murine splenocytes. *J. Immunol. Methods* 239, 95-107.
- Besin, G., Gaudreau, S., Ménard, M., Guindi, C., Dupuis, G., et Amrani, A. (2008). Thymic stromal lymphopoietin and thymic stromal lymphopoietin-conditioned dendritic cells induce regulatory T-cell differentiation and protection of NOD mice against diabetes. *Diabetes* 57, 2107-2117.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L., et Kuchroo, V. K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235-238.
- 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, 1283-1288.

- Biburger, M., Theiner, G., Schadle, M., Schuler, G., et Tiegs, G. (2009). Pivotal Advance: Heme oxygenase 1 expression by human CD4+ T cells is not sufficient for their development of immunoregulatory capacity. *J Leukoc Biol*. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19797297.
- Birmingham, C. L., Smith, A. C., Bakowski, M. A., Yoshimori, T., et Brumell, J. H. (2006). Autophagy controls Salmonella infection in response to damage to the Salmonella-containing vacuole. *J. Biol. Chem* 281, 11374-11383.
- Björck, P. (2001). Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice. *Blood* 98, 3520-3526.
- Blancou, P., et Anegon, I. (2010). Heme oxygenase-1 and dendritic cells: what else? *Journal of Leukocytes Biology* 87, in press.
- Blander, J. M. (2008). Phagocytosis and antigen presentation: a partnership initiated by Toll-like receptors. *Ann. Rheum. Dis* 67 Suppl 3, iii44-49.
- Blander, J. M., et Medzhitov, R. (2004). Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science* 304, 1014-1018.
- Blum, J. S., et Cresswell, P. (1988). Role for intracellular proteases in the processing and transport of class II HLA antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 85, 3975-3979.
- Bogunovic, M., Ginhoux, F., Helft, J., Shang, L., Hashimoto, D., Greter, M., Liu, K., Jakubzick, C., Ingersoll, M. A., Leboeuf, M., et al. (2009). Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* 31, 513-525.
- Boise, L. H., Noel, P. J., et Thompson, C. B. (1995). CD28 and apoptosis. *Curr. Opin. Immunol* 7, 620-625.
- Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M. C., et Steinman, R. M. (2002). Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J. Exp. Med* 196, 1627-1638.
- Bouche, D., Chauveau, C., Roussel, J. C., Mathieu, P., Braudeau, C., Tesson, L., Soullillou, J. P., Iyer, S., Buelow, R., et Anegon, I. (2002). Inhibition of graft arteriosclerosis development in rat aortas following heme oxygenase-1 gene transfer. *Transpl Immunol* 9, 235-8.
- Bouchon, A., Hernández-Munain, C., Cella, M., et Colonna, M. (2001). A DAP12-mediated pathway regulates expression of CC chemokine receptor 7 and maturation of human dendritic cells. *J. Exp. Med* 194, 1111-1122.
- Bougnères, L., Helft, J., Tiwari, S., Vargas, P., Chang, B. H., Chan, L., Campisi, L., Lauvau, G., Hugues, S., Kumar, P., et al. (2009). A role for lipid bodies in the cross-presentation of phagocytosed antigens by MHC class I in dendritic cells. *Immunity* 31,

232-244.

- Brasel, K., De Smedt, T., Smith, J. L., et Maliszewski, C. R. (2000). Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. *Blood* 96, 3029-3039.
- Braudeau, C., Bouchet, D., Tesson, L., Iyer, S., Remy, S., Buelow, R., Anegon, I., et Chauveau, C. (2004). Induction of long-term cardiac allograft survival by heme oxygenase-1 gene transfer. *Gene Ther* 11, 701-10.
- Brawand, P., Fitzpatrick, D. R., Greenfield, B. W., Brasel, K., Maliszewski, C. R., et De Smedt, T. (2002). Murine plasmacytoid pre-dendritic cells generated from Flt3 ligand-supplemented bone marrow cultures are immature APCs. *J. Immunol* 169, 6711-6719.
- Brazil, M. I., Weiss, S., et Stockinger, B. (1997). Excessive degradation of intracellular protein in macrophages prevents presentation in the context of major histocompatibility complex class II molecules. *Eur. J. Immunol* 27, 1506-1514.
- Brenan, M., et Puklavec, M. (1992). The MRC OX-62 antigen: a useful marker in the purification of rat veiled cells with the biochemical properties of an integrin. *J. Exp. Med* 175, 1457-1465.
- Brenner, D., Krammer, P. H., et Arnold, R. (2008). Concepts of activated T cell death. *Crit. Rev. Oncol. Hematol* 66, 52-64.
- Brocker, T., Riedinger, M., et Karjalainen, K. (1997). Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J. Exp. Med* 185, 541-550.
- Bromley, S. K., Mempel, T. R., et Luster, A. D. (2008). Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nat. Immunol* 9, 970-980.
- Brunner, T., Mogil, R. J., LaFace, D., Yoo, N. J., Mahboubi, A., Echeverri, F., Martin, S. J., Force, W. R., Lynch, D. H., et Ware, C. F. (1995). Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* 373, 441-444.
- Bueno, S. M., Riedel, C. A., Carreño, L. J., et Kalergis, A. M. (2010). Virulence mechanisms displayed by Salmonella to impair dendritic cell function. *Curr. Med. Chem* 17, 1156-1166.
- Bueno, S. M., Tobar, J. A., Iruretagoyena, M. I., et Kalergis, A. M. (2005). Molecular interactions between dendritic cells and Salmonella: escape from adaptive immunity and implications on pathogenesis. *Crit. Rev. Immunol* 25, 389-403.
- Buis, C. I., van der Steege, G., Visser, D. S., Nolte, I. M., Hepkema, B. G., Nijsten, M., Slooff, M. J., et Porte, R. J. (2008). Heme oxygenase-1 genotype of the donor is associated with graft survival after liver transplantation. *Am J Transplant* 8, 377-85.

- Burgdorf, S., Kautz, A., Böhnert, V., Knolle, P. A., et Kurts, C. (2007). Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science* *316*, 612-616.
- Burgdorf, S., et Kurts, C. (2008). Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. *Current Opinion in Immunology* *20*, 89-95.
- Burgdorf, S., Schölz, C., Kautz, A., Tampé, R., et Kurts, C. (2008). Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. *Nat. Immunol* *9*, 558-566.
- Bursch, L. S., Wang, L., Igyarto, B., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Kaplan, D. H., et Hogquist, K. A. (2007). Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells. *J. Exp. Med* *204*, 3147-3156.
- Cambi, A., Koopman, M., et Figdor, C. G. (2005). How C-type lectins detect pathogens. *Cell. Microbiol* *7*, 481-488.
- Cameron, M. J., Arreaza, G. A., Grattan, M., Meagher, C., Sharif, S., Burdick, M. D., Strieter, R. M., Cook, D. N., et Delovitch, T. L. (2000). Differential expression of CC chemokines and the CCR5 receptor in the pancreas is associated with progression to type I diabetes. *J. Immunol* *165*, 1102-1110.
- Caminschi, I., Proietto, A. I., Ahmet, F., Kitsoulis, S., Shin Teh, J., Lo, J. C. Y., Rizzitelli, A., Wu, L., Vremec, D., van Dommelen, S. L. H., et al. (2008). The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. *Blood* *112*, 3264-3273.
- Carrier, Y., Yuan, J., Kuchroo, V. K., et Weiner, H. L. (2007). Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. *J. Immunol* *178*, 179-185.
- Carter, R. W., Thompson, C., Reid, D. M., Wong, S. Y. C., et Tough, D. F. (2006). Preferential induction of CD4+ T cell responses through in vivo targeting of antigen to dendritic cell-associated C-type lectin-1. *J. Immunol* *177*, 2276-2284.
- Caux, C., Durand, I., Moreau, I., Duvert, V., Saeland, S., et Banchereau, J. (1993). Tumor necrosis factor alpha cooperates with interleukin 3 in the recruitment of a primitive subset of human CD34+ progenitors. *J. Exp. Med* *177*, 1815-1820.
- Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Van Kooten, C., Durand, I., et Banchereau, J. (1994). Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J. Exp. Med* *180*, 1263-1272.
- Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Dezutter-Dambuyant, C., de Saint-Vis, B., Jacquet, C., Yoneda, K., Imamura, S., Schmitt, D., et Banchereau, J. (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*, 695-706.

- Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A., et Alber, G. (1996). Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J. Exp. Med* 184, 747-752.
- Chabannes, D., Hill, M., Merieau, E., Rossignol, J., Brion, R., Soullillou, J. P., Anegon, I., et Cuturi, M. C. (2007). A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells. *Blood* 110, 3691-4.
- Chatenoud, L., et Bluestone, J. A. (2007). CD3-specific antibodies: a portal to the treatment of autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol* 7, 622-632.
- Chauveau, C., Bouchet, D., Roussel, J., Mathieu, P., Braudeau, C., Renaudin, K., Tesson, L., Soullillou, J., Iyer, S., Buelow, R., et al. (2002). Gene transfer of heme oxygenase-1 and carbon monoxide delivery inhibit chronic rejection. *Am J Transplant.* 2, 581-92.
- Chauveau, C., Rémy, S., Royer, P. J., Hill, M., Tanguy-Royer, S., Hubert, F., Tesson, L., Brion, R., Beriou, G., Gregoire, M., et al. (2005). Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood* 106, 1694-1702.
- Chen, Y., Kuchroo, V. K., Inobe, J., Hafler, D. A., et Weiner, H. L. (1994). Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265, 1237-1240.
- Chicha, L., Jarrossay, D., et Manz, M. G. (2004). Clonal type I interferon-producing and dendritic cell precursors are contained in both human lymphoid and myeloid progenitor populations. *J. Exp. Med* 200, 1519-1524.
- Choi, B. M., Pae, H. O., Jeong, Y. R., Kim, Y. M., et Chung, H. T. (2005). Critical role of heme oxygenase-1 in Foxp3-mediated immune suppression. *Biochem Biophys Res Commun* 327, 1066-71.
- Chora, A. A., Fontoura, P., Cunha, A., Pais, T. F., Cardoso, S., Ho, P. P., Lee, L. Y., Sobel, R. A., Steinman, L., et Soares, M. P. (2007). Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress autoimmune neuroinflammation. *J Clin Invest* 117, 438-47.
- Chorro, L., Sarde, A., Li, M., Woollard, K. J., Chambon, P., Malissen, B., Kissenpfennig, A., Barbaroux, J., Groves, R., et Geissmann, F. (2009). Langerhans cell (LC) proliferation mediates neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network. *J. Exp. Med* 206, 3089-3100.
- Chronoes, Z. C., Abdolrasulnia, R., Whitsett, J. A., Rice, W. R., et Shepherd, V. L. (1996). Purification of a cell-surface receptor for surfactant protein A. *J. Biol. Chem* 271, 16375-16383.
- Chung, S. W., Liu, X., Macias, A. A., Baron, R. M., et Perrella, M. A. (2008). Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide enhances the host defense response to microbial sepsis in mice. *J Clin Invest* 118, 239-47.

- Clarke, H. M., Shrivastava, S., Motterlini, R., Sawle, P., Chen, D., et Dorling, A. (2009). Donor HO-1 expression inhibits intimal hyperplasia in unmanipulated graft recipients: a potential role for CD8+ T-cell modulation by carbon monoxide. *Transplantation* 88, 653-61.
- Clausen, B. E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R., et Forster, I. (1999). Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res* 8, 265-77.
- Coban, C., Ishii, K. J., Kawai, T., Hemmi, H., Sato, S., Uematsu, S., Yamamoto, M., Takeuchi, O., Itagaki, S., Kumar, N., et al. (2005). Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J. Exp. Med* 201, 19-25.
- Coomes, J. L., Siddiqui, K. R. R., Arancibia-Cárcamo, C. V., Hall, J., Sun, C., Belkaid, Y., et Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med* 204, 1757-1764.
- Courtney, A. E., McNamee, P. T., Middleton, D., Heggarty, S., Patterson, C. C., et Maxwell, A. P. (2007). Association of functional heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism with renal transplantation outcomes. *Am J Transplant* 7, 908-13.
- Cresswell, P. (1996). Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* 84, 505-507.
- Creusot, R. J., Yaghoubi, S. S., Chang, P., Chia, J., Contag, C. H., Gambhir, S. S., et Fathman, C. G. (2009). Lymphoid-tissue-specific homing of bone-marrow-derived dendritic cells. *Blood* 113, 6638-6647.
- Cumberbatch, M., Dearman, R. J., et Kimber, I. (1997). Langerhans cells require signals from both tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta for migration. *Immunology* 92, 388-395.
- Curtsinger, J. M., et Mescher, M. F. (2010). Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr. Opin. Immunol* 22, 333-340.
- D'Amico, A., et Wu, L. (2003). The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. *J. Exp. Med* 198, 293-303.
- Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I., et Trombetta, E. S. (2005). Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* 307, 1630-1634.
- Delgado, M. A., Elmaoued, R. A., Davis, A. S., Kyei, G., et Deretic, V. (2008). Toll-like receptors control autophagy. *EMBO J* 27, 1110-1121.
- Delneste, Y., Magistrelli, G., Gauchat, J., Haeuw, J., Aubry, J., Nakamura, K., Kawakami-Honda, N., Goetsch, L., Sawamura, T., Bonnefoy, J., et al. (2002). Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity* 17, 353-362.

- Desjardins, M. (2003). ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nat. Rev. Immunol* 3, 280-291.
- Dieu, M. C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J. M., Oldham, E., Aït-Yahia, S., Brière, F., Zlotnik, A., Lebecque, S., et Caux, C. (1998). Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J. Exp. Med* 188, 373-386.
- Donskoy, E., et Goldschneider, I. (2003). Two developmentally distinct populations of dendritic cells inhabit the adult mouse thymus: demonstration by differential importation of hematogenous precursors under steady state conditions. *J. Immunol* 170, 3514-3521.
- Dörfel, D., Appel, S., Grünebach, F., Weck, M. M., Müller, M. R., Heine, A., et Brossart, P. (2005). Processing and presentation of HLA class I and II epitopes by dendritic cells after transfection with in vitro-transcribed MUC1 RNA. *Blood* 105, 3199-3205.
- Dudziak, D., Kamphorst, A. O., Heidkamp, G. F., Buchholz, V. R., Trumfheller, C., Yamazaki, S., Cheong, C., Liu, K., Lee, H., Park, C. G., et al. (2007). Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* 315, 107-111.
- Dustin, M. L., et Cooper, J. A. (2000). The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nat. Immunol* 1, 23-29.
- Edwards, A. D., Diebold, S. S., Slack, E. M. C., Tomizawa, H., Hemmi, H., Kaisho, T., Akira, S., et Reis e Sousa, C. (2003). Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *Eur. J. Immunol* 33, 827-833.
- Egen, J. G., et Allison, J. P. (2002). Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity* 16, 23-35.
- Ejrnaes, M., Videbaek, N., Christen, U., Cooke, A., Michelsen, B. K., et von Herrath, M. (2005). Different diabetogenic potential of autoaggressive CD8+ clones associated with IFN-gamma-inducible protein 10 (CXC chemokine ligand 10) production but not cytokine expression, cytolytic activity, or homing characteristics. *J. Immunol* 174, 2746-2755.
- Engel, D., Dobrindt, U., Tittel, A., Peters, P., Maurer, J., Gütgemann, I., Kaissling, B., Kuziel, W., Jung, S., et Kurts, C. (2006). Tumor necrosis factor alpha- and inducible nitric oxide synthase-producing dendritic cells are rapidly recruited to the bladder in urinary tract infection but are dispensable for bacterial clearance. *Infect. Immun* 74, 6100-6107.
- Enk, A. H., et Katz, S. I. (1992). Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 89, 1398-1402.
- Epiphonio, S., Mikolajczak, S. A., Gonçalves, L. A., Pamplona, A., Portugal, S., Albuquerque, S., Goldberg, M., Rebelo, S., Anderson, D. G., Akinc, A., et al. (2008). Heme oxygenase-1 is an anti-inflammatory host factor that promotes murine

- plasmodium liver infection. *Cell Host Microbe* 3, 331-338.
- Essery, G., Feldmann, M., et Lamb, J. R. (1988). Interleukin-2 can prevent and reverse antigen-induced unresponsiveness in cloned human T lymphocytes. *Immunology* 64, 413-417.
- Exner, M., Bohmig, G. A., Schillinger, M., Regele, H., Watschinger, B., Horl, W. H., Raith, M., Mannhalter, C., et Wagner, O. F. (2004). Donor heme oxygenase-1 genotype is associated with renal allograft function. *Transplantation* 77, 538-42.
- Fantini, M. C., Becker, C., Monteleone, G., Pallone, F., Galle, P. R., et Neurath, M. F. (2004). Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J. Immunol* 172, 5149-5153.
- Fife, B. T., Guleria, I., Gubbels Bupp, M., Eagar, T. N., Tang, Q., Bour-Jordan, H., Yagita, H., Azuma, M., Sayegh, M. H., et Bluestone, J. A. (2006). Insulin-induced remission in new-onset NOD mice is maintained by the PD-1-PD-L1 pathway. *J. Exp. Med* 203, 2737-2747.
- Figdor, C. G., van Kooyk, Y., et Adema, G. J. (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat. Rev. Immunol* 2, 77-84.
- Fogg, D. K., Sibon, C., Miled, C., Jung, S., Aucouturier, P., Littman, D. R., Cumano, A., et Geissmann, F. (2006). A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 311, 83-87.
- Förster, R., Davalos-Miszlitz, A. C., et Rot, A. (2008). CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat. Rev. Immunol* 8, 362-371.
- Frigerio, S., Junt, T., Lu, B., Gerard, C., Zumsteg, U., Holländer, G. A., et Piali, L. (2002). Beta cells are responsible for CXCR3-mediated T-cell infiltration in insulinitis. *Nat. Med* 8, 1414-1420.
- Fujimoto, T., Ohsaki, Y., Cheng, J., Suzuki, M., et Shinohara, Y. (2008). Lipid droplets: a classic organelle with new outfits. *Histochem. Cell Biol* 130, 263-279.
- Fukata, M., Vamadevan, A. S., et Abreu, M. T. (2009). Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. *Semin. Immunol* 21, 242-253.
- Fukaura, H., Kent, S. C., Pietruszewicz, M. J., Khoury, S. J., Weiner, H. L., et Hafler, D. A. (1996). Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. *J. Clin. Invest* 98, 70-77.
- Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P. H., Steele-Mortimer, O., Paiement, J., Bergeron, J. J. M., et Desjardins, M. (2002). Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* 110, 119-131.
- Gallegos, A. M., et Bevan, M. J. (2004). Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J. Exp. Med* 200, 1039-1049.

- Gavanescu, I., Kessler, B., Ploegh, H., Benoist, C., et Mathis, D. (2007). Loss of Aire-dependent thymic expression of a peripheral tissue antigen renders it a target of autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *104*, 4583-4587.
- Geijtenbeek, T. B., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Adema, G. J., van Kooyk, Y., et Figdor, C. G. (2000). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* *100*, 575-585.
- Geissmann, F., Jung, S., et Littman, D. R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* *19*, 71-82.
- Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M., et Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* *327*, 656-661.
- George, J. F., Braun, A., Brusko, T. M., Joseph, R., Bolisetty, S., Wasserfall, C. H., Atkinson, M. A., Agarwal, A., et Kapturczak, M. H. (2008). Suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells is dependent on expression of heme oxygenase-1 in antigen-presenting cells. *Am J Pathol* *173*, 154-60.
- GeurtsvanKessel, C. H., Willart, M. A. M., van Rijt, L. S., Muskens, F., Kool, M., Baas, C., Thielemans, K., Bennett, C., Clausen, B. E., Hoogsteden, H. C., et al. (2008). Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin+CD11b- but not plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med* *205*, 1621-1634.
- Ghaziani, T., Shan, Y., Lambrecht, R. W., Donohue, S. E., Pietschmann, T., Bartenschlager, R., et Bonkovsky, H. L. (2006). HCV proteins increase expression of heme oxygenase-1 (HO-1) and decrease expression of Bach1 in human hepatoma cells. *J Hepatol* *45*, 5-12.
- Gilliet, M., Boonstra, A., Paturel, C., Antonenko, S., Xu, X., Trinchieri, G., O'Garra, A., et Liu, Y. (2002). The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med* *195*, 953-958.
- Ginhoux, F., Collin, M. P., Bogunovic, M., Abel, M., Leboeuf, M., Helft, J., Ochando, J., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Grisotto, M., et al. (2007). Blood-derived dermal langerin+ dendritic cells survey the skin in the steady state. *J. Exp. Med* *204*, 3133-3146.
- Ginhoux, F., Liu, K., Helft, J., Bogunovic, M., Greter, M., Hashimoto, D., Price, J., Yin, N., Bromberg, J., Lira, S. A., et al. (2009). The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *J. Exp. Med* *206*, 3115-3130.
- Glawe, J. D., Patrick, D. R., Huang, M., Sharp, C. D., Barlow, S. C., et Kevil, C. G. (2009). Genetic deficiency of Itgb2 or ItgaL prevents autoimmune diabetes through distinctly different mechanisms in NOD/LtJ mice. *Diabetes* *58*, 1292-1301.
- Goldberg, A., Parolini, M., Chin, B. Y., Czismadia, E., Otterbein, L. E., Bach, F. H., et Wang,

- H. (2007). Toll-like receptor 4 suppression leads to islet allograft survival. *Faseb J* 21, 2840-8.
- Gordon, S., et Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol* 5, 953-964.
- Gronski, M. A., et Weinem, M. (2006). Death pathways in T cell homeostasis and their role in autoimmune diabetes. *Rev Diabet Stud* 3, 88-95.
- Grouard, G., Rissoan, M. C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J., et Liu, Y. J. (1997). The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J. Exp. Med* 185, 1101-1111.
- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J. E., et Roncarolo, M. G. (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737-742.
- Guermonprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P., et Amigorena, S. (2003). ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425, 397-402.
- Guillonnet, C., Hill, M., Hubert, F. X., Chiffoleau, E., Herve, C., Li, X. L., Heslan, M., Usal, C., Tesson, L., Menoret, S., et al. (2007). CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 117, 1096-106.
- Gutierrez, M. G., Master, S. S., Singh, S. B., Taylor, G. A., Colombo, M. I., et Deretic, V. (2004). Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell* 119, 753-766.
- den Haan, J. M., Lehar, S. M., et Bevan, M. J. (2000). CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J. Exp. Med* 192, 1685-1696.
- Hackstein, H., Morelli, A. E., et Thomson, A. W. (2001). Designer dendritic cells for tolerance induction: guided not misguided missiles. *Trends Immunol* 22, 437-42.
- Hackstein, H., et Thomson, A. W. (2004). Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat Rev Immunol* 4, 24-35.
- Hadeiba, H., Sato, T., Habtezion, A., Oderup, C., Pan, J., et Butcher, E. C. (2008). CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nat. Immunol* 9, 1253-1260.
- van Halteren, A. G. S., Kardol, M. J., Mulder, A., et Roep, B. O. (2005). Homing of human autoreactive T cells into pancreatic tissue of NOD-scid mice. *Diabetologia* 48, 75-82.
- Hänninen, A., Nurmela, R., Maksimow, M., Heino, J., Jalkanen, S., et Kurts, C. (2007). Islet beta-cell-specific T cells can use different homing mechanisms to infiltrate and destroy pancreatic islets. *Am. J. Pathol* 170, 240-250.

- Haspot, F., Séveno, C., Dugast, A., Coulon, F., Renaudin, K., Usal, C., Hill, M., Anegon, I., Heslan, M., Josien, R., et al. (2005). Anti-CD28 antibody-induced kidney allograft tolerance related to tryptophan degradation and TCR class II B7 regulatory cells. *Am. J. Transplant* 5, 2339-2348.
- Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., et Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410, 1099-1103.
- Heath, W. R., Belz, G. T., Behrens, G. M. N., Smith, C. M., Forehan, S. P., Parish, I. A., Davey, G. M., Wilson, N. S., Carbone, F. R., et Villadangos, J. A. (2004). Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol. Rev* 199, 9-26.
- de Heer, H. J., Hammad, H., Soullié, T., Hijdra, D., Vos, N., Willart, M. A. M., Hoogsteden, H. C., et Lambrecht, B. N. (2004). Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J. Exp. Med* 200, 89-98.
- Helft, J., Ginhoux, F., Bogunovic, M., et Merad, M. (2010). Origin and functional heterogeneity of non-lymphoid tissue dendritic cells in mice. *Immunol. Rev* 234, 55-75.
- Hemati, B., Contreras, V., Urien, C., Bonneau, M., Takamatsu, H., Mertens, P. P. C., Bréard, E., Sailleau, C., Zientara, S., et Schwartz-Cornil, I. (2009). Bluetongue virus targets conventional dendritic cells in skin lymph. *J. Virol* 83, 8789-8799.
- Henry, C. J., Ornelles, D. A., Mitchell, L. M., Brzoza-Lewis, K. L., et Hiltbold, E. M. (2008). IL-12 produced by dendritic cells augments CD8+ T cell activation through the production of the chemokines CCL1 and CCL17. *J. Immunol* 181, 8576-8584.
- Hikino, H., Miyagi, T., Hua, Y., Hirohisa, S., Gold, D. P., Li, X. -, Fujino, M., Tetsuya, T., Amemiya, H., Suzuki, S., et al. (2000). GM-CSF-independent development of dendritic cells from bone marrow cells in the GM-CSF-receptor-deficient mouse. *Transplantation Proceedings* 32, 2458-2459.
- Hommelgaard, A. M., Roepstorff, K., Vilhardt, F., Torgersen, M. L., Sandvig, K., et van Deurs, B. (2005). Caveolae: stable membrane domains with a potential for internalization. *Traffic* 6, 720-724.
- Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M. F., Thibault, P., Sacks, D., et Desjardins, M. (2003). Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425, 402-406.
- Howarth, M., Williams, A., Tolstrup, A. B., et Elliott, T. (2004). Tapasin enhances MHC class I peptide presentation according to peptide half-life. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 101, 11737-11742.
- Howland, S. W., et Wittrup, K. D. (2008). Antigen release kinetics in the phagosome are critical to cross-presentation efficiency. *J. Immunol* 180, 1576-1583.

- Hribova, P., Reinke, P., Petrasek, J., Brabcova, I., Hubacek, J. A., et Viklicky, O. (2008). Heme oxygenase-1 polymorphisms and renal transplantation outcomes: balancing at the detection limit of allelic association studies. *Am J Transplant* 8, 1077-8; author reply 1079.
- Hu, C. M., Lin, H. H., Chiang, M. T., Chang, P. F., et Chau, L. Y. (2007). Systemic expression of heme oxygenase-1 ameliorates type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes* 56, 1240-7.
- Huang, F. P., Platt, N., Wykes, M., Major, J. R., Powell, T. J., Jenkins, C. D., et MacPherson, G. G. (2000). A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J. Exp. Med* 191, 435-444.
- Hubert, F. X., Voisine, C., Louvet, C., Heslan, M., et Josien, R. (2004). Rat plasmacytoid dendritic cells are an abundant subset of MHC class II+ CD4+CD11b-OX62- and type I IFN-producing cells that exhibit selective expression of Toll-like receptors 7 and 9 and strong responsiveness to CpG. *J Immunol* 172, 7485-94.
- Idoyaga, J., Suda, N., Suda, K., Park, C. G., et Steinman, R. M. (2009). Antibody to Langerin/CD207 localizes large numbers of CD8alpha+ dendritic cells to the marginal zone of mouse spleen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 106, 1524-1529.
- Inaba, K., Inaba, M., Deguchi, M., Hagi, K., Yasumizu, R., Ikehara, S., Muramatsu, S., et Steinman, R. M. (1993a). Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major histocompatibility complex class II-negative progenitor in mouse bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 90, 3038-3042.
- Inaba, K., Inaba, M., Deguchi, M., Hagi, K., Yasumizu, R., Ikehara, S., Muramatsu, S., et Steinman, R. M. (1993b). Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major histocompatibility complex class II-negative progenitor in mouse bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 90, 3038-3042.
- Irla, M., K pfer, N., Suter, T., Lissilaa, R., Benkhoucha, M., Skupsky, J., Lalive, P. H., Fontana, A., Reith, W., et Hugues, S. (2010). MHC class II-restricted antigen presentation by plasmacytoid dendritic cells inhibits T cell-mediated autoimmunity. *J. Exp. Med* 207, 1891-1905.
- Ishikawa, S., Sato, T., Abe, M., Nagai, S., Onai, N., Yoneyama, H., Zhang, Y., Suzuki, T., Hashimoto, S., Shirai, T., et al. (2001). Aberrant high expression of B lymphocyte chemokine (BLC/CXCL13) by C11b+CD11c+ dendritic cells in murine lupus and preferential chemotaxis of B1 cells towards BLC. *J. Exp. Med* 193, 1393-1402.
- Iwasaki, A. (2009). Local advantage: skin DCs prime; skin memory T cells protect. *Nat. Immunol* 10, 451-453.
- Iyoda, T., Shimoyama, S., Liu, K., Omatsu, Y., Akiyama, Y., Maeda, Y., Takahara, K., Steinman, R. M., et Inaba, K. (2002). The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J. Exp. Med* 195, 1289-1302.
- Jakob, T., et Udey, M. C. (1998). Regulation of E-cadherin-mediated adhesion in Langerhans

- cell-like dendritic cells by inflammatory mediators that mobilize Langerhans cells in vivo. *J. Immunol* 160, 4067-4073.
- Jancic, C., Savina, A., Wasmeier, C., Tolmachova, T., El-Benna, J., Dang, P. M., Pascolo, S., Gougerot-Pocidallo, M., Raposo, G., Seabra, M. C., et al. (2007). Rab27a regulates phagosomal pH and NADPH oxidase recruitment to dendritic cell phagosomes. *Nat. Cell Biol* 9, 367-378.
- Jarvik, T., Smillie, C., Groisman, E. A., et Ochman, H. (2010). Short-Term Signatures of Evolutionary Change in the *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium 14028 Genome. *J. Bacteriol.* 192, 560-567.
- Jensen, P. E. (2007). Recent advances in antigen processing and presentation. *Nat. Immunol* 8, 1041-1048.
- Jiang, A., Bloom, O., Ono, S., Cui, W., Unternaehrer, J., Jiang, S., Whitney, J. A., Connolly, J., Banchereau, J., et Mellman, I. (2007). Disruption of E-cadherin-mediated adhesion induces a functionally distinct pathway of dendritic cell maturation. *Immunity* 27, 610-624.
- Johng, H., Yoo, J. S., Yoon, T., Shin, H., Lee, B., Lee, C., Lee, J., et Soh, K. (2007). Use of magnetic nanoparticles to visualize threadlike structures inside lymphatic vessels of rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 4, 77-82.
- Johnson, L. A., Clasper, S., Holt, A. P., Lalor, P. F., Baban, D., et Jackson, D. G. (2006). An inflammation-induced mechanism for leukocyte transmigration across lymphatic vessel endothelium. *J. Exp. Med* 203, 2763-2777.
- Jongbloed, S. L., Kassianos, A. J., McDonald, K. J., Clark, G. J., Ju, X., Angel, C. E., Chen, C. J., Dunbar, P. R., Wadley, R. B., Jeet, V., et al. (2010). Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J. Exp. Med* 207, 1247-1260.
- Joosten, S. A., van Meijgaarden, K. E., Savage, N. D. L., de Boer, T., Triebel, F., van der Wal, A., de Heer, E., Klein, M. R., Geluk, A., et Ottenhoff, T. H. M. (2007). Identification of a human CD8+ regulatory T cell subset that mediates suppression through the chemokine CC chemokine ligand 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 104, 8029-8034.
- Ju, X., Clark, G., et Hart, D. N. J. (2010). Review of human DC subtypes. *Methods Mol. Biol* 595, 3-20.
- Jurk, M., Heil, F., Vollmer, J., Schetter, C., Krieg, A. M., Wagner, H., Lipford, G., et Bauer, S. (2002). Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat. Immunol* 3, 499.
- Kabashima, K., Banks, T. A., Ansel, K. M., Lu, T. T., Ware, C. F., et Cyster, J. G. (2005). Intrinsic lymphotoxin-beta receptor requirement for homeostasis of lymphoid tissue dendritic cells. *Immunity* 22, 439-450.

- Kabashima, K., Shiraishi, N., Sugita, K., Mori, T., Onoue, A., Kobayashi, M., Sakabe, J., Yoshiki, R., Tamamura, H., Fujii, N., et al. (2007). CXCL12-CXCR4 engagement is required for migration of cutaneous dendritic cells. *Am. J. Pathol* 171, 1249-1257.
- Kaczorowski, D. J., Nakao, A., Mollen, K. P., Vallabhaneni, R., Sugimoto, R., Kohmoto, J., Tobita, K., Zuckerbraun, B. S., McCurry, K. R., Murase, N., et al. (2007). Toll-like receptor 4 mediates the early inflammatory response after cold ischemia/reperfusion. *Transplantation* 84, 1279-87.
- Kaczorowski, D. J., Nakao, A., Vallabhaneni, R., Mollen, K. P., Sugimoto, R., Kohmoto, J., Zuckerbraun, B. S., McCurry, K. R., et Billiar, T. R. (2009). Mechanisms of Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated inflammation after cold ischemia/reperfusion in the heart. *Transplantation* 87, 1455-63.
- Kagan, J. C., Su, T., Horng, T., Chow, A., Akira, S., et Medzhitov, R. (2008). TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat. Immunol* 9, 361-368.
- Kaizu, T., Ikeda, A., Nakao, A., Tsung, A., Toyokawa, H., Ueki, S., Geller, D. A., et Murase, N. (2008). Protection of transplant-induced hepatic ischemia/reperfusion injury with carbon monoxide via MEK/ERK1/2 pathway downregulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294, G236-44.
- Kaplan, D. H., Jenison, M. C., Saeland, S., Shlomchik, W. D., et Shlomchik, M. J. (2005). Epidermal langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity. *Immunity* 23, 611-620.
- Kapturczak, M. H., Wasserfall, C., Brusko, T., Campbell-Thompson, M., Ellis, T. M., Atkinson, M. A., et Agarwal, A. (2004). Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse. *Am J Pathol* 165, 1045-53.
- Kawai, T., et Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol* 11, 373-384.
- Kawai, T., et Akira, S. (2008). Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 1143, 1-20.
- Kearney, E. R., Pape, K. A., Loh, D. Y., et Jenkins, M. K. (1994). Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo. *Immunity* 1, 327-339.
- Kinchen, J. M., et Ravichandran, K. S. (2008). Phagosome maturation: going through the acid test. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 9, 781-795.
- Kirino, M., Kirino, Y., Takeno, M., Nagashima, Y., Takahashi, K., Kobayashi, M., Murakami, S., Hirasawa, T., Ueda, A., Aihara, M., et al. (2008). Heme oxygenase 1 attenuates the development of atopic dermatitis-like lesions in mice: implications for human disease. *J Allergy Clin Immunol* 122, 290-7, 297 e1-8.

- Kitada, O., Kodama, T., Kuribayashi, K., Ihaku, D., Fujita, M., Matsuyama, T., et Sugita, M. (2001). Heme oxygenase-1 (HO-1) protein induction in a mouse model of asthma. *Clin Exp Allergy* 31, 1470-7.
- Klechevsky, E., Morita, R., Liu, M., Cao, Y., Coquery, S., Thompson-Snipes, L., Briere, F., Chaussabel, D., Zurawski, G., Palucka, A. K., et al. (2008). Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells. *Immunity* 29, 497-510.
- Kondo, M., Weissman, I. L., et Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91, 661-672.
- Kotsch, K., Martins, P. N., Klemz, R., Janssen, U., Gerstmayer, B., Dernier, A., Reutzel-Selke, A., Kuckelkorn, U., Tullius, S. G., et Volk, H. D. (2007). Heme oxygenase-1 ameliorates ischemia/reperfusion injury by targeting dendritic cell maturation and migration. *Antioxid Redox Signal* 9, 2049-63.
- Krammer, P. H., Arnold, R., et Lavrik, I. N. (2007). Life and death in peripheral T cells. *Nat. Rev. Immunol* 7, 532-542.
- Krug, A., Veeraswamy, R., Pekosz, A., Kanagawa, O., Unanue, E. R., Colonna, M., et Cella, M. (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, 899-906.
- Kruger, B., Krick, S., Dhillon, N., Lerner, S. M., Ames, S., Bromberg, J. S., Lin, M., Walsh, L., Vella, J., Fischereeder, M., et al. (2009). Donor Toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3390-5.
- Kumar, A., Deshane, J. S., Crossman, D. K., Bolisetty, S., Yan, B. S., Kramnik, I., Agarwal, A., et Steyn, A. J. (2008). Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide induces the Mycobacterium tuberculosis dormancy regulon. *J Biol Chem* 283, 18032-9.
- Kushwah, R., Wu, J., Oliver, J. R., Jiang, G., Zhang, J., Siminovitch, K. A., et Hu, J. (2010). Uptake of apoptotic DC converts immature DC into tolerogenic DC that induce differentiation of Foxp3+ Treg. *Eur. J. Immunol* 40, 1022-1035.
- Kyewski, B., Derbinski, J., Gotter, J., et Klein, L. (2002). Promiscuous gene expression and central T-cell tolerance: more than meets the eye. *Trends Immunol* 23, 364-371.
- Langerhans, P. (1868). Ueber die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Archiv* 44, 325-337.
- Laouar, Y., Welte, T., Fu, X., et Flavell, R. A. (2003). STAT3 is required for Flt3L-dependent dendritic cell differentiation. *Immunity* 19, 903-912.
- Le, P. U., Guay, G., Altschuler, Y., et Nabi, I. R. (2002). Caveolin-1 is a negative regulator of caveolae-mediated endocytosis to the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem* 277, 3371-3379.

- Lee, D. Y., Lee, S., Nam, J. H., et Byun, Y. (2006). Minimization of immunosuppressive therapy after islet transplantation: combined action of heme oxygenase-1 and PEGylation to islet. *Am J Transplant* 6, 1820-8.
- Lee, J. H., Kang, S. G., et Kim, C. H. (2007a). FoxP3⁺ T cells undergo conventional first switch to lymphoid tissue homing receptors in thymus but accelerated second switch to nonlymphoid tissue homing receptors in secondary lymphoid tissues. *J. Immunol* 178, 301-311.
- Lee, S. S., Gao, W., Mazzola, S., Thomas, M. N., Csizmadia, E., Otterbein, L. E., Bach, F. H., et Wang, H. (2007b). Heme oxygenase-1, carbon monoxide, and bilirubin induce tolerance in recipients toward islet allografts by modulating T regulatory cells. *Faseb J* 21, 3450-7.
- Lee, T. S., et Chau, L. Y. (2002). Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med* 8, 240-6.
- Lehuen, A., Diana, J., Zaccane, P., et Cooke, A. (2010). Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nat. Rev. Immunol* 10, 501-513.
- Lennon-Duménil, A., Bakker, A. H., Maehr, R., Fiebiger, E., Overkleeft, H. S., Roseblatt, M., Ploegh, H. L., et Lagaudrière-Gesbert, C. (2002). Analysis of protease activity in live antigen-presenting cells shows regulation of the phagosomal proteolytic contents during dendritic cell activation. *J. Exp. Med* 196, 529-540.
- Leulier, F., et Lemaitre, B. (2008). Toll-like receptors--taking an evolutionary approach. *Nat. Rev. Genet* 9, 165-178.
- Li, M., Peterson, S., Husney, D., Inaba, M., Guo, K., Kappas, A., Ikehara, S., et Abraham, N. G. (2007a). Long-lasting expression of HO-1 delays progression of type I diabetes in NOD mice. *Cell Cycle* 6, 567-71.
- Li, M., Peterson, S., Husney, D., Inaba, M., Guo, K., Terada, E., Morita, T., Patil, K., Kappas, A., Ikehara, S., et al. (2007b). Interdiction of the diabetic state in NOD mice by sustained induction of heme oxygenase: possible role of carbon monoxide and bilirubin. *Antioxid Redox Signal* 9, 855-63.
- Li, X. L., Ménoret, S., Bezie, S., Caron, L., Chabannes, D., Hill, M., Halary, F., Angin, M., Heslan, M., Usal, C., et al. (2010). Mechanism and localization of CD8 regulatory T cells in a heart transplant model of tolerance. *J. Immunol* 185, 823-833.
- Li, Y., Li, G., Dong, W., Chen, J., Lu, D., et Tan, J. (2006). Transplantation of rat islets transduced with human heme oxygenase-1 gene using adenovirus vector. *Pancreas* 33, 280-6.
- Liang, B., Workman, C., Lee, J., Chew, C., Dale, B. M., Colonna, L., Flores, M., Li, N., Schweighoffer, E., Greenberg, S., et al. (2008). Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J. Immunol* 180, 5916-5926.

- Lilley, B. N., et Ploegh, H. L. (2004). A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* *429*, 834-840.
- Lin, M. L., Zhan, Y., Proietto, A. I., Prato, S., Wu, L., Heath, W. R., Villadangos, J. A., et Lew, A. M. (2008). Selective suicide of cross-presenting CD8⁺ dendritic cells by cytochrome c injection shows functional heterogeneity within this subset. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *105*, 3029-3034.
- Linsley, P. S., et Ledbetter, J. A. (1993). The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu. Rev. Immunol* *11*, 191-212.
- Listopad, J., Asadullah, K., Sievers, C., Ritter, T., Meisel, C., Sabat, R., et Docke, W. D. (2007). Heme oxygenase-1 inhibits T cell-dependent skin inflammation and differentiation and function of antigen-presenting cells. *Exp Dermatol* *16*, 661-70.
- Liu, K., Victora, G. D., Schwickert, T. A., Guermontprez, P., Meredith, M. M., Yao, K., Chu, F., Randolph, G. J., Rudensky, A. Y., et Nussenzweig, M. (2009). In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* *324*, 392-397.
- Liu, Y., Li, P., Lu, J., Xiong, W., Oger, J., Tetzlaff, W., et Cynader, M. (2008). Bilirubin possesses powerful immunomodulatory activity and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* *181*, 1887-97.
- Lo, J., Peng, R. H., Barker, T., Xia, C., et Clare-Salzler, M. J. (2006). Peptide-pulsed immature dendritic cells reduce response to beta cell target antigens and protect NOD recipients from type I diabetes. *Ann. N. Y. Acad. Sci* *1079*, 153-156.
- Lord, G. M., Rao, R. M., Choe, H., Sullivan, B. M., Lichtman, A. H., Luscinskas, F. W., et Glimcher, L. H. (2005). T-bet is required for optimal proinflammatory CD4⁺ T-cell trafficking. *Blood* *106*, 3432-3439.
- Loss, G. E., et Sant, A. J. (1993). Invariant chain retains MHC class II molecules in the endocytic pathway. *J. Immunol* *150*, 3187-3197.
- Luckashenak, N., Schroeder, S., Endt, K., Schmidt, D., Mahnke, K., Bachmann, M. F., Marconi, P., Deeg, C. A., et Brocker, T. (2008). Constitutive crosspresentation of tissue antigens by dendritic cells controls CD8⁺ T cell tolerance in vivo. *Immunity* *28*, 521-532.
- Ludwinski, M. W., Sun, J., Hilliard, B., Gong, S., Xue, F., Carmody, R. J., DeVirgiliis, J., et Chen, Y. H. (2009). Critical roles of Bim in T cell activation and T cell-mediated autoimmune inflammation in mice. *J. Clin. Invest* *119*, 1706-1713.
- Lui, G., Manches, O., Angel, J., Molens, J., Chaperot, L., et Plumas, J. (2009). Plasmacytoid dendritic cells capture and cross-present viral antigens from influenza-virus exposed cells. *PLoS ONE* *4*, e7111.
- Lumsden, J. M., Williams, J. A., et Hodes, R. J. (2003). Differential requirements for expression of CD80/86 and CD40 on B cells for T-dependent antibody responses in

- vivo. *J. Immunol* 170, 781-787.
- Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R., et Iwasaki, A. (2003). Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med* 198, 513-520.
- Luo, X., Herold, K. C., et Miller, S. D. (2010). Immunotherapy of type 1 diabetes: where are we and where should we be going? *Immunity* 32, 488-499.
- Lutz, M. B., Kukutsch, N., Ogilvie, A. L., Rössner, S., Koch, F., Romani, N., et Schuler, G. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods* 223, 77-92.
- Lutz, M. B., et Schuler, G. (2002a). Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 23, 445-9.
- Lutz, M. B., et Schuler, G. (2002b). Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 23, 445-449.
- Manicassamy, S., et Pulendran, B. (2009). Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors. *Semin. Immunol* 21, 185-193.
- Manicassamy, S., Ravindran, R., Deng, J., Oluoch, H., Denning, T. L., Kasturi, S. P., Rosenthal, K. M., Evavold, B. D., et Pulendran, B. (2009). Toll-like receptor 2-dependent induction of vitamin A-metabolizing enzymes in dendritic cells promotes T regulatory responses and inhibits autoimmunity. *Nat Med* 15, 401-409.
- Mantegazza, A. R., Savina, A., Vermeulen, M., Perez, L., Geffner, J., Hermine, O., Rosenzweig, S. D., Faure, F., et Amigorena, S. (2008). NADPH oxidase controls phagosomal pH and antigen cross-presentation in human dendritic cells. *Blood* 112, 4712-22.
- Mantovani, A., Bonecchi, R., et Locati, M. (2006). Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. *Nat. Rev. Immunol* 6, 907-918.
- Manz, M. G., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I. L., et Akashi, K. (2001). Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* 97, 3333-3341.
- Marsland, B. J., Bättig, P., Bauer, M., Ruedl, C., Lässig, U., Beerli, R. R., Dietmeier, K., Ivanova, L., Pfister, T., Vogt, L., et al. (2005). CCL19 and CCL21 induce a potent proinflammatory differentiation program in licensed dendritic cells. *Immunity* 22, 493-505.
- Martin-Fontecha, A., Sebastiani, S., Höpken, U. E., Ugucioni, M., Lipp, M., Lanzavecchia, A., et Sallusto, F. (2003). Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J. Exp. Med* 198, 615-621.
- Martz, E. (1987). LFA-1 and other accessory molecules functioning in adhesions of T and B lymphocytes. *Hum. Immunol* 18, 3-37.

- Massey, D. C. O., et Parkes, M. (2007). Genome-wide association scanning highlights two autophagy genes, ATG16L1 and IRGM, as being significantly associated with Crohn's disease. *Autophagy* 3, 649-651.
- Mathew, A., MacLean, J. A., DeHaan, E., Tager, A. M., Green, F. H., et Luster, A. D. (2001). Signal transducer and activator of transcription 6 controls chemokine production and T helper cell type 2 cell trafficking in allergic pulmonary inflammation. *J. Exp. Med* 193, 1087-1096.
- McAllister, S. C., Hansen, S. G., Ruhl, R. A., Raggo, C. M., DeFilippis, V. R., Greenspan, D., Fruh, K., et Moses, A. V. (2004). Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) induces heme oxygenase-1 expression and activity in KSHV-infected endothelial cells. *Blood* 103, 3465-73.
- McKenna, H. J., Stocking, K. L., Miller, R. E., Brasel, K., De Smedt, T., Maraskovsky, E., Maliszewski, C. R., Lynch, D. H., Smith, J., Pulendran, B., et al. (2000). Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 95, 3489-3497.
- Melli, K., Friedman, R. S., Martin, A. E., Finger, E. B., Miao, G., Szot, G. L., Krummel, M. F., et Tang, Q. (2009). Amplification of autoimmune response through induction of dendritic cell maturation in inflamed tissues. *J. Immunol* 182, 2590-2600.
- Menges, M., Rössner, S., Voigtländer, C., Schindler, H., Kukutsch, N. A., Bogdan, C., Erb, K., Schuler, G., et Lutz, M. B. (2002). Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J. Exp. Med* 195, 15-21.
- Merad, M., Ginhoux, F., et Collin, M. (2008). Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol* 8, 935-947.
- Merad, M., Hoffmann, P., Ranheim, E., Slaymaker, S., Manz, M. G., Lira, S. A., Charo, I., Cook, D. N., Weissman, I. L., Strober, S., et al. (2004). Depletion of host Langerhans cells before transplantation of donor alloreactive T cells prevents skin graft-versus-host disease. *Nat. Med* 10, 510-517.
- Merad, M., et Manz, M. G. (2009). Dendritic cell homeostasis. *Blood* 113, 3418-3427.
- Methe, H., Zimmer, E., Grimm, C., Nabauer, M., et Koglin, J. (2004). Evidence for a role of toll-like receptor 4 in development of chronic allograft rejection after cardiac transplantation. *Transplantation* 78, 1324-31.
- Mikhak, Z., Fleming, C. M., Medoff, B. D., Thomas, S. Y., Tager, A. M., Campanella, G. S., et Luster, A. D. (2006). STAT1 in peripheral tissue differentially regulates homing of antigen-specific Th1 and Th2 cells. *J. Immunol* 176, 4959-4967.
- Miloud, T., Hämmerling, G. J., et Garbi, N. (2010). Review of murine dendritic cells: types, location, and development. *Methods Mol. Biol* 595, 21-42.

- Mizuno, K., Toma, T., Tsukiji, H., Okamoto, H., Yamazaki, H., Ohta, K., Ohta, K., Kasahara, Y., Koizumi, S., et Yachie, A. (2005). Selective expansion of CD16^{high}CCR2⁺ subpopulation of circulating monocytes with preferential production of haem oxygenase (HO)-1 in response to acute inflammation. *Clinical & Experimental Immunology* 142, 461-470.
- Moreau, A., Hill, M., Thebault, P., Deschamps, J. Y., Chiffolleau, E., Chauveau, C., Moullier, P., Anegon, I., Alliot-Licht, B., et Cuturi, M. C. (2009). Tolerogenic dendritic cells actively inhibit T cells through heme oxygenase-1 in rodents and in nonhuman primates. *FASEB J* 23, 3070-7.
- Morelli, A. E., et Thomson, A. W. (2007). Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol* 7, 610-21.
- Morse, D., Pischke, S. E., Zhou, Z., Davis, R. J., Flavell, R. A., Loop, T., Otterbein, S. L., Otterbein, L. E., et Choi, A. M. (2003). Suppression of inflammatory cytokine production by carbon monoxide involves the JNK pathway and AP-1. *J Biol Chem* 278, 36993-8.
- Mouriès, J., Moron, G., Schlecht, G., Escriou, N., Dadaglio, G., et Leclerc, C. (2008). Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naive T cells in vivo after TLR activation. *Blood* 112, 3713-3722.
- Naik, S. H., Metcalf, D., van Nieuwenhuijze, A., Wicks, I., Wu, L., O'Keeffe, M., et Shortman, K. (2006). Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat. Immunol* 7, 663-671.
- Naik, S. H., Proietto, A. I., Wilson, N. S., Dakic, A., Schnorrer, P., Fuchsberger, M., Lahoud, M. H., O'Keeffe, M., Shao, Q., Chen, W., et al. (2005). Cutting edge: generation of splenic CD8⁺ and CD8⁻ dendritic cell equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures. *J. Immunol* 174, 6592-6597.
- Naik, S. H., Sathe, P., Park, H., Metcalf, D., Proietto, A. I., Dakic, A., Carotta, S., O'Keeffe, M., Bahlo, M., Papenfuss, A., et al. (2007). Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat. Immunol* 8, 1217-1226.
- Nakahira, K., Kim, H. P., Geng, X. H., Nakao, A., Wang, X., Murase, N., Drain, P. F., Sasidhar, M., Nabel, E. G., Takahashi, T., et al. (2006). Carbon monoxide differentially inhibits TLR signaling pathways by regulating ROS-induced trafficking of TLRs to lipid rafts. *J Exp Med* 203, 2377-89.
- Nakano, H., Yanagita, M., et Gunn, M. D. (2001). CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med* 194, 1171-1178.
- Nakao, A., Kimizuka, K., Stolz, D. B., Seda Neto, J., Kaizu, T., Choi, A. M., Uchiyama, T., Zuckerbraun, B. S., Bauer, A. J., Nalesnik, M. A., et al. (2003). Protective effect of carbon monoxide inhalation for cold-preserved small intestinal grafts. *Surgery* 134, 285-92.

- Nakao, A., Neto, J. S., Kanno, S., Stolz, D. B., Kimizuka, K., Liu, F., Bach, F. H., Billiar, T. R., Choi, A. M., Otterbein, L. E., et al. (2005). Protection against ischemia/reperfusion injury in cardiac and renal transplantation with carbon monoxide, biliverdin and both. *Am J Transplant* 5, 282-91.
- Nakao, A., Toyokawa, H., Tsung, A., Nalesnik, M. A., Stolz, D. B., Kohmoto, J., Ikeda, A., Tomiyama, K., Harada, T., Takahashi, T., et al. (2006). Ex vivo application of carbon monoxide in University of Wisconsin solution to prevent intestinal cold ischemia/reperfusion injury. *Am J Transplant* 6, 2243-55.
- Narni-Mancinelli, E., Campisi, L., Bassand, D., Cazareth, J., Gounon, P., Glaichenhaus, N., et Lauvau, G. (2007). Memory CD8+ T cells mediate antibacterial immunity via CCL3 activation of TNF/ROI+ phagocytes. *J. Exp. Med* 204, 2075-2087.
- Nath, K. A., Vercellotti, G. M., Grande, J. P., Miyoshi, H., Paya, C. V., Manivel, J. C., Haggard, J. J., Croatt, A. J., Payne, W. D., et Alam, J. (2001). Heme protein-induced chronic renal inflammation: suppressive effect of induced heme oxygenase-1. *Kidney Int* 59, 106-17.
- Neto, J. S., Nakao, A., Kimizuka, K., Romanosky, A. J., Stolz, D. B., Uchiyama, T., Nalesnik, M. A., Otterbein, L. E., et Murase, N. (2004). Protection of transplant-induced renal ischemia-reperfusion injury with carbon monoxide. *Am J Physiol Renal Physiol* 287, F979-89.
- Niess, J. H., Brand, S., Gu, X., Landsman, L., Jung, S., McCormick, B. A., Vyas, J. M., Boes, M., Ploegh, H. L., Fox, J. G., et al. (2005). CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 307, 254-258.
- Nikolic, T., de Bruijn, M. F. T. R., Lutz, M. B., et Leenen, P. J. M. (2003). Developmental stages of myeloid dendritic cells in mouse bone marrow. *Int. Immunol* 15, 515-524.
- Nimmerjahn, F., Milosevic, S., Behrends, U., Jaffee, E. M., Pardoll, D. M., Bornkamm, G. W., et Mautner, J. (2003). Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *Eur. J. Immunol* 33, 1250-1259.
- Norkin, L. C. (2001). Caveolae in the uptake and targeting of infectious agents and secreted toxins. *Adv. Drug Deliv. Rev* 49, 301-315.
- Nurieva, R., Yang, X. O., Chung, Y., et Dong, C. (2009). Cutting edge: in vitro generated Th17 cells maintain their cytokine expression program in normal but not lymphopenic hosts. *J. Immunol* 182, 2565-2568.
- Ochando, J. C., Homma, C., Yang, Y., Hidalgo, A., Garin, A., Tacke, F., Angeli, V., Li, Y., Boros, P., Ding, Y., et al. (2006). Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat. Immunol* 7, 652-662.
- Ogden, C. A., deCathelineau, A., Hoffmann, P. R., Bratton, D., Ghebrehiwet, B., Fadok, V. A., et Henson, P. M. (2001). C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells.

- J. Exp. Med *194*, 781-795.
- O'Keeffe, M., Hochrein, H., Vremec, D., Caminschi, I., Miller, J. L., Anders, E. M., Wu, L., Lahoud, M. H., Henri, S., Scott, B., et al. (2002). Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8(+) dendritic cells only after microbial stimulus. *J. Exp. Med* *196*, 1307-1319.
- O'Neill, H. C., Wilson, H. L., Quah, B., Abbey, J. L., Despars, G., et Ni, K. (2004). Dendritic cell development in long-term spleen stromal cultures. *Stem Cells* *22*, 475-486.
- Otterbein, L. E., Bach, F. H., Alam, J., Soares, M., Tao Lu, H., Wysk, M., Davis, R. J., Flavell, R. A., et Choi, A. M. (2000). Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* *6*, 422-8.
- Ouabed, A., Hubert, F., Chabannes, D., Gautreau, L., Heslan, M., et Josien, R. (2008). Differential control of T regulatory cell proliferation and suppressive activity by mature plasmacytoid versus conventional spleen dendritic cells. *J. Immunol* *180*, 5862-5870.
- Ozaki, K. S., Marques, G. M., Nogueira, E., Feitoza, R. Q., Cenedeze, M. A., Franco, M. F., Mazzali, M., Soares, M. P., Pacheco-Silva, A., et Camara, N. O. (2008). Improved renal function after kidney transplantation is associated with heme oxygenase-1 polymorphism. *Clin Transplant* *22*, 609-16.
- Pae, H. O., Oh, G. S., Choi, B. M., Chae, S. C., et Chung, H. T. (2003). Differential expressions of heme oxygenase-1 gene in CD25- and CD25+ subsets of human CD4+ T cells. *Biochem Biophys Res Commun* *306*, 701-5.
- Pae, H. O., Oh, G. S., Choi, B. M., Chae, S. C., Kim, Y. M., Chung, K. R., et Chung, H. T. (2004). Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation via inhibition of IL-2 production. *J Immunol* *172*, 4744-51.
- Paludan, C., Schmid, D., Landthaler, M., Vockerodt, M., Kube, D., Tuschl, T., et Münz, C. (2005). Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science* *307*, 593-596.
- Pamplona, A., Ferreira, A., Balla, J., Jeney, V., Balla, G., Epiphonio, S., Chora, A., Rodrigues, C. D., Gregoire, I. P., Cunha-Rodrigues, M., et al. (2007). Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nat Med* *13*, 703-10.
- Park, D. J., Agarwal, A., et George, J. F. (2010). Heme oxygenase-1 expression in murine dendritic cell subpopulations: effect on CD8+ dendritic cell differentiation in vivo. *Am. J. Pathol* *176*, 2831-2839.
- Parton, R. G., et Lindsay, M. (1999). Exploitation of major histocompatibility complex class I molecules and caveolae by simian virus 40. *Immunol. Rev* *168*, 23-31.
- Pascale, F., Pascale, F., Contreras, V., Bonneau, M., Courbet, A., Chilmonczyk, S., Bevilacqua, C., Epardaud, M., Eparaud, M., Niborski, V., et al. (2008). Plasmacytoid

- dendritic cells migrate in afferent skin lymph. *J. Immunol* 180, 5963-5972.
- Paulsson, K. M., Jevon, M., Wang, J. W., Li, S., et Wang, P. (2006). The double lysine motif of tapasin is a retrieval signal for retention of unstable MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *J. Immunol* 176, 7482-7488.
- Peche, H., Trinite, B., Martinet, B., et Cuturi, M. C. (2005). Prolongation of heart allograft survival by immature dendritic cells generated from recipient type bone marrow progenitors. *Am J Transplant* 5, 255-67.
- Pelayo, R., Hirose, J., Huang, J., Garrett, K. P., Delogu, A., Busslinger, M., et Kincade, P. W. (2005). Derivation of 2 categories of plasmacytoid dendritic cells in murine bone marrow. *Blood* 105, 4407-4415.
- Pfeifer, J. D., Wick, M. J., Roberts, R. L., Findlay, K., Normark, S. J., et Harding, C. V. (1993). Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* 361, 359-362.
- Pierre, P., et Mellman, I. (1998). Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells. *Cell* 93, 1135-1145.
- Pittock, S. T., Norby, S. M., Grande, J. P., Croatt, A. J., Bren, G. D., Badley, A. D., Caplice, N. M., Griffin, M. D., et Nath, K. A. (2005). MCP-1 is up-regulated in unstressed and stressed HO-1 knockout mice: Pathophysiologic correlates. *Kidney Int* 68, 611-22.
- Ploegh, H. L. (2007). A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. *Nature* 448, 435-438.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., et al. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085-2088.
- Pooley, J. L., Heath, W. R., et Shortman, K. (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, 5327-5330.
- Poss Kd, et Tonegawa S (1997a). Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 10919-24.
- Poss Kd, et Tonegawa S (1997b). Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *PNAS* 94, 10925-30.
- Proietto, A. I., van Dommelen, S., Zhou, P., Rizzitelli, A., D'Amico, A., Steptoe, R. J., Naik, S. H., Lahoud, M. H., Liu, Y., Zheng, P., et al. (2008). Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 105, 19869-19874.
- Protzer, U., Seyfried, S., Quasdorff, M., Sass, G., Svorcova, M., Webb, D., Bohne, F., Hosel, M., Schirmacher, P., et Tiegs, G. (2007). Antiviral activity and hepatoprotection by

- heme oxygenase-1 in hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 133, 1156-65.
- Pugh, C. W., MacPherson, G. G., et Steer, H. W. (1983). Characterization of nonlymphoid cells derived from rat peripheral lymph. *J. Exp. Med* 157, 1758-1779.
- Pulendran, B., Tang, H., et Denning, T. L. (2008). Division of labor, plasticity, and crosstalk between dendritic cell subsets. *Curr. Opin. Immunol* 20, 61-67.
- Pulskens, W. P., Teske, G. J., Butter, L. M., Roelofs, J. J., van der Poll, T., Florquin, S., et Leemans, J. C. (2008). Toll-like receptor-4 coordinates the innate immune response of the kidney to renal ischemia/reperfusion injury. *PLoS One* 3, e3596.
- Querec, T. (2006). Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *Journal of Experimental Medicine* 203, 413-424.
- Rallabhandi, P., Bell, J., Boukhvalova, M. S., Medvedev, A., Lorenz, E., Arditi, M., Hemming, V. G., Blanco, J. C., Segal, D. M., et Vogel, S. N. (2006). Analysis of TLR4 polymorphic variants: new insights into TLR4/MD-2/CD14 stoichiometry, structure, and signaling. *J Immunol* 177, 322-32.
- Randolph, G. J., Beaulieu, S., Lebecque, S., Steinman, R. M., et Muller, W. A. (1998). Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 282, 480-483.
- Ratzinger, G., Stoitzner, P., Ebner, S., Lutz, M. B., Layton, G. T., Rainer, C., Senior, R. M., Shipley, J. M., Fritsch, P., Schuler, G., et al. (2002). Matrix metalloproteinases 9 and 2 are necessary for the migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells from human and murine skin. *J. Immunol* 168, 4361-4371.
- Reis e Sousa, C. (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nat. Rev. Immunol* 6, 476-483.
- Remy, S., Blancou, P., Tesson, L., Tardif, V., Brion, R., Royer, P. J., Motterlini, R., Foresti, R., Painchaut, M., Pogu, S., et al. (2009). Carbon monoxide inhibits TLR-induced dendritic cell immunogenicity. *J Immunol* 182, 1877-84.
- Ren, H., Leib, S. L., Ferriero, D. M., Tauber, M. G., et Christen, S. (2007). Induction of haem oxygenase-1 causes cortical non-haem iron increase in experimental pneumococcal meningitis: evidence that concomitant ferritin up-regulation prevents iron-induced oxidative damage. *J Neurochem* 100, 532-44.
- Rescigno, M., Citterio, S., Thèry, C., Rittig, M., Medaglini, D., Pozzi, G., Amigorena, S., et Ricciardi-Castagnoli, P. (1998). Bacteria-induced neo-biosynthesis, stabilization, and surface expression of functional class I molecules in mouse dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95, 5229-5234.
- Rescigno, M., Rotta, G., Valzasina, B., et Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers. *Immunobiology* 204, 572-581.
- Rescigno, M. (2009). Before they were gut dendritic cells. *Immunity* 31, 454-456.

- Rodriguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P., et Amigorena, S. (1999). Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat. Cell Biol* 1, 362-368.
- Roth, M. G. (2006). Clathrin-mediated endocytosis before fluorescent proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 7, 63-68.
- Russell, D. G., et Yates, R. M. (2007). TLR signalling and phagosome maturation: an alternative viewpoint. *Cell. Microbiol* 9, 849-850.
- Rutella, S., Danese, S., et Leone, G. (2006). Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood* 108, 1435-1440.
- Rydkina, E., Sahni, A., Baggs, R. B., Silverman, D. J., et Sahni, S. K. (2006). Infection of human endothelial cells with spotted Fever group rickettsiae stimulates cyclooxygenase 2 expression and release of vasoactive prostaglandins. *Infect Immun* 74, 5067-74.
- Ryter, S. W., Alam, J., et Choi, A. M. (2006). Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* 86, 583-650.
- Salio, M., Palmowski, M. J., Atzberger, A., Hermans, I. F., et Cerundolo, V. (2004). CpG-matured murine plasmacytoid dendritic cells are capable of in vivo priming of functional CD8 T cell responses to endogenous but not exogenous antigens. *J. Exp. Med* 199, 567-579.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., et Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med* 182, 389-400.
- Sallusto, F., et Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med* 179, 1109-1118.
- Sanjuan, M. A., Dillon, C. P., Tait, S. W. G., Moshiah, S., Dorsey, F., Connell, S., Komatsu, M., Tanaka, K., Cleveland, J. L., Withoff, S., et al. (2007). Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature* 450, 1253-1257.
- Sapozhnikov, A., Fischer, J. A. A., Zaft, T., Krauthgamer, R., Dzionek, A., et Jung, S. (2007). Organ-dependent in vivo priming of naive CD4+, but not CD8+, T cells by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med* 204, 1923-1933.
- Sathe, P., et Shortman, K. (2008). The steady-state development of splenic dendritic cells. *Mucosal Immunol* 1, 425-431.
- Sato, K., Balla, J., Otterbein, L., Smith, R., Brouard, S., Lin, Y., Csizmadia, E., Sevigny, J.,

- Robson, S., Vercellotti, G., et al. (2001). Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses the rejection of mouse-to-rat cardiac transplants. *J. Immunol* 166, 4185-4194.
- Saunders, D., Lucas, K., Ismaili, J., Wu, L., Maraskovsky, E., Dunn, A., et Shortman, K. (1996). Dendritic cell development in culture from thymic precursor cells in the absence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med* 184, 2185-2196.
- Sauter, B., Albert, M. L., Francisco, L., Larsson, M., Somersan, S., et Bhardwaj, N. (2000). Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J. Exp. Med* 191, 423-434.
- Saveanu, L., Carroll, O., Weimershaus, M., Guermonprez, P., Firat, E., Lindo, V., Greer, F., Davoust, J., Kratzer, R., Keller, S. R., et al. (2009). IRAP identifies an endosomal compartment required for MHC class I cross-presentation. *Science* 325, 213-217.
- Savina, A., Jancic, C., Hugues, S., Guermonprez, P., Vargas, P., Moura, I. C., Lennon-Dumenil, A. M., Seabra, M. C., Raposo, G., et Amigorena, S. (2006). NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell* 126, 205-18.
- Savina, A., et Amigorena, S. (2007). Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol. Rev* 219, 143-156.
- Savinov, A. Y., et Burn, P. (2010). Interference with islet-specific homing of autoreactive T cells: an emerging therapeutic strategy for type 1 diabetes. *Drug Discov Today*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/20685342> [Accédé Août 16, 2010].
- Savinov, A. Y., Rozanov, D. V., Golubkov, V. S., Wong, F. S., et Strongin, A. Y. (2005). Inhibition of membrane type-1 matrix metalloproteinase by cancer drugs interferes with the homing of diabetogenic T cells into the pancreas. *J. Biol. Chem* 280, 27755-27758.
- Savinov, A. Y., Rozanov, D. V., et Strongin, A. Y. (2006). Mechanistic insights into targeting T cell membrane proteinase to promote islet beta-cell rejuvenation in type 1 diabetes. *FASEB J* 20, 1793-1801.
- Savinov, A. Y., Rozanov, D. V., et Strongin, A. Y. (2007). Specific inhibition of autoimmune T cell transmigration contributes to beta cell functionality and insulin synthesis in non-obese diabetic (NOD) mice. *J. Biol. Chem* 282, 32106-32111.
- Savinov, A. Y., et Strongin, A. Y. (2007). Defining the roles of T cell membrane proteinase and CD44 in type 1 diabetes. *IUBMB Life* 59, 6-13.
- Savinov, A. Y., Wong, F. S., Stonebraker, A. C., et Chervonsky, A. V. (2003). Presentation of antigen by endothelial cells and chemoattraction are required for homing of insulin-specific CD8+ T cells. *J. Exp. Med* 197, 643-656.

- Schaerli, P., Willmann, K., Ebert, L. M., Walz, A., et Moser, B. (2005). Cutaneous CXCL14 targets blood precursors to epidermal niches for Langerhans cell differentiation. *Immunity* 23, 331-342.
- Schaible, U. E., Winau, F., Sieling, P. A., Fischer, K., Collins, H. L., Hagens, K., Modlin, R. L., Brinkmann, V., et Kaufmann, S. H. E. (2003). Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nat. Med* 9, 1039-1046.
- Schäkel, K., von Kietzell, M., Hänsel, A., Ebling, A., Schulze, L., Haase, M., Semmler, C., Sarfati, M., Barclay, A. N., Randolph, G. J., et al. (2006). Human 6-sulfo LacNAc-expressing dendritic cells are principal producers of early interleukin-12 and are controlled by erythrocytes. *Immunity* 24, 767-777.
- Schnorrer, P., Behrens, G. M. N., Wilson, N. S., Pooley, J. L., Smith, C. M., El-Sukkari, D., Davey, G., Kupresanin, F., Li, M., Maraskovsky, E., et al. (2006). The dominant role of CD8+ dendritic cells in cross-presentation is not dictated by antigen capture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 103, 10729-10734.
- Schroder, K., et Tschopp, J. (2010). The inflammasomes. *Cell* 140, 821-832.
- Schulz, O., Diebold, S. S., Chen, M., Näslund, T. I., Nolte, M. A., Alexopoulou, L., Azuma, Y., Flavell, R. A., Liljeström, P., et Reis e Sousa, C. (2005). Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* 433, 887-892.
- Segura, E., Albiston, A. L., Wicks, I. P., Chai, S. Y., et Villadangos, J. A. (2009). Different cross-presentation pathways in steady-state and inflammatory dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 106, 20377-20381.
- Segura, E., et Villadangos, J. A. (2009). Antigen presentation by dendritic cells in vivo. *Curr. Opin. Immunol* 21, 105-110.
- Segura, E., Wong, J., et Villadangos, J. A. (2009). Cutting edge: B220+CCR9- dendritic cells are not plasmacytoid dendritic cells but are precursors of conventional dendritic cells. *J. Immunol* 183, 1514-1517.
- Seixas, E., Gozzelino, R., Chora, A., Ferreira, A., Silva, G., Larsen, R., Rebelo, S., Penido, C., Smith, N. R., Coutinho, A., et al. (2009). Heme oxygenase-1 affords protection against noncerebral forms of severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 15837-42.
- Serbina, N. V., Salazar-Mather, T. P., Biron, C. A., Kuziel, W. A., et Pamer, E. G. (2003). TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* 19, 59-70.
- Serwold, T., Gonzalez, F., Kim, J., Jacob, R., et Shastri, N. (2002). ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 419, 480-483.

- Sharpe, A. H., et Freeman, G. J. (2002). The B7-CD28 superfamily. *Nat. Rev. Immunol* 2, 116-126.
- Shen, L., Sigal, L. J., Boes, M., et Rock, K. L. (2004). Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity* 21, 155-165.
- Shen, X. D., Ke, B., Zhai, Y., Gao, F., Busuttil, R. W., Cheng, G., et Kupiec-Weglinski, J. W. (2005). Toll-like receptor and heme oxygenase-1 signaling in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Am J Transplant* 5, 1793-800.
- Shevach, E. M. (2006). From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 25, 195-201.
- Shiloh, M. U., Manzanillo, P., et Cox, J. S. (2008). Mycobacterium tuberculosis senses host-derived carbon monoxide during macrophage infection. *Cell Host Microbe* 3, 323-30.
- Shklovskaya, E., Roediger, B., et Fazekas de St Groth, B. (2008). Epidermal and dermal dendritic cells display differential activation and migratory behavior while sharing the ability to stimulate CD4+ T cell proliferation in vivo. *J. Immunol* 181, 418-430.
- Shortman, K., et Heath, W. R. (2010). The CD8+ dendritic cell subset. *Immunol. Rev* 234, 18-31.
- Shortman, K., et Naik, S. H. (2007). Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat. Rev. Immunol* 7, 19-30.
- Sigal, L. J., Crotty, S., Andino, R., et Rock, K. L. (1999). Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature* 398, 77-80.
- Sinnis, P., et Ernst, J. D. (2008). CO-opting the host HO-1 pathway in tuberculosis and malaria. *Cell Host Microbe* 3, 277-9.
- Smit, J. J., Rudd, B. D., et Lukacs, N. W. (2006). Plasmacytoid dendritic cells inhibit pulmonary immunopathology and promote clearance of respiratory syncytial virus. *J. Exp. Med* 203, 1153-1159.
- Soares, M. P., Lin, Y., Anrather, J., Csizmadia, E., Takigami, K., Sato, K., Grey, S. T., Colvin, R. B., Choi, A. M., Poss, K. D., et al. (1998). Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. *Nat Med* 4, 1073-7.
- Solomon, M., Balasa, B., et Sarvetnick, N. (2010). CCR2 and CCR5 chemokine receptors differentially influence the development of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Autoimmunity* 43, 156-163.
- Song, R., Mahidhara, R. S., Zhou, Z., Hoffman, R. A., Seol, D. W., Flavell, R. A., Billiar, T. R., Otterbein, L. E., et Choi, A. M. (2004). Carbon monoxide inhibits T lymphocyte proliferation via caspase-dependent pathway. *J Immunol* 172, 1220-6.

- Steinman, R. M., Turley, S., Mellman, I., et Inaba, K. (2000). The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J. Exp. Med* *191*, 411-416.
- Steinman, R. M., Hawiger, D., et Nussenzweig, M. C. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* *21*, 685-711.
- Steinman, R. M., et Cohn, Z. A. (2007). Pillars Article: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* *193*: 1142-1162. *J. Immunol* *178*, 5-25.
- Stockinger, B., Veldhoen, M., et Martin, B. (2007). Th17 T cells: linking innate and adaptive immunity. *Semin. Immunol* *19*, 353-361.
- Strobl, H., Riedl, E., Scheinecker, C., Bello-Fernandez, C., Pickl, W. F., Rappersberger, K., Majdic, O., et Knapp, W. (1996). TGF-beta 1 promotes in vitro development of dendritic cells from CD34+ hemopoietic progenitors. *J. Immunol* *157*, 1499-1507.
- Sundrud, M. S., Grill, S. M., Ni, D., Nagata, K., Alkan, S. S., Subramaniam, A., et Unutmaz, D. (2003). Genetic reprogramming of primary human T cells reveals functional plasticity in Th cell differentiation. *J. Immunol* *171*, 3542-3549.
- Swords, W. E., Cannon, B. M., et Benjamin, W. H. (1997). Avirulence of LT2 strains of *Salmonella typhimurium* results from a defective *rpoS* gene. *Infect. Immun* *65*, 2451-2453.
- Syrbe, U., Siveke, J., et Hamann, A. (1999). Th1/Th2 subsets: distinct differences in homing and chemokine receptor expression? *Springer Semin. Immunopathol* *21*, 263-285.
- Szatmari, I., Töröcsik, D., Agostini, M., Nagy, T., Gurnell, M., Barta, E., Chatterjee, K., et Nagy, L. (2007). PPARgamma regulates the function of human dendritic cells primarily by altering lipid metabolism. *Blood* *110*, 3271-3280.
- Taille, C., El-Benna, J., Lanone, S., Boczkowski, J., et Motterlini, R. (2005). Mitochondrial respiratory chain and NAD(P)H oxidase are targets for the antiproliferative effect of carbon monoxide in human airway smooth muscle. *J Biol Chem* *280*, 25350-60.
- Taille, C., El-Benna, J., Lanone, S., Dang, M. C., Ogier-Denis, E., Aubier, M., et Boczkowski, J. (2004). Induction of heme oxygenase-1 inhibits NAD(P)H oxidase activity by down-regulating cytochrome b558 expression via the reduction of heme availability. *J Biol Chem* *279*, 28681-8.
- Takamiya, R., Murakami, M., Kajimura, M., Goda, N., Makino, N., Takamiya, Y., Yamaguchi, T., Ishimura, Y., Hozumi, N., et Suematsu, M. (2002). Stabilization of mast cells by heme oxygenase-1: an anti-inflammatory role. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* *283*, H861-70.
- Takeda, K., et Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol* *17*, 1-14.
- Takegahara, N., Takamatsu, H., Toyofuku, T., Tsujimura, T., Okuno, T., Yukawa, K., Mizui, M., Yamamoto, M., Prasad, D. V. R., Suzuki, K., et al. (2006). Plexin-A1 and its

- interaction with DAP12 in immune responses and bone homeostasis. *Nat. Cell Biol* 8, 615-622.
- Takeuchi, O., Kaufmann, A., Grote, K., Kawai, T., Hoshino, K., Morr, M., Mühlradt, P. F., et Akira, S. (2000). Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J. Immunol* 164, 554-557.
- Takeuchi, O., Kawai, T., Mühlradt, P. F., Morr, M., Radolf, J. D., Zychlinsky, A., Takeda, K., et Akira, S. (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int. Immunol* 13, 933-940.
- Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R. L., et Akira, S. (2002). Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J. Immunol* 169, 10-14.
- Tang, A., Amagai, M., Granger, L. G., Stanley, J. R., et Udey, M. C. (1993). Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature* 361, 82-85.
- Tenner, A. J., Robinson, S. L., et Ezekowitz, R. A. (1995). Mannose binding protein (MBP) enhances mononuclear phagocyte function via a receptor that contains the 126,000 M(r) component of the C1q receptor. *Immunity* 3, 485-493.
- Théry, C., et Amigorena, S. (2001). The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol* 13, 45-51.
- Thomsen, P., Roepstorff, K., Stahlhut, M., et van Deurs, B. (2002). Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking. *Mol. Biol. Cell* 13, 238-250.
- Thomson, A. W. (2010). Tolerogenic dendritic cells: all present and correct? *Am. J. Transplant* 10, 214-219.
- Thornton, A. M., et Shevach, E. M. (1998). CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med* 188, 287-296.
- Tisch, R. (2010). Immunogenic versus tolerogenic dendritic cells: a matter of maturation. *Int. Rev. Immunol* 29, 111-118.
- Tobar, J. A., Carreño, L. J., Bueno, S. M., González, P. A., Mora, J. E., Quezada, S. A., et Kalergis, A. M. (2006). Virulent *Salmonella enterica* serovar typhimurium evades adaptive immunity by preventing dendritic cells from activating T cells. *Infect. Immun* 74, 6438-6448.
- Tobar, J. A., González, P. A., et Kalergis, A. M. (2004). *Salmonella* escape from antigen presentation can be overcome by targeting bacteria to Fc gamma receptors on dendritic cells. *J. Immunol* 173, 4058-4065.

- Tomasello, E., Desmoulin, P. O., Chemin, K., Guia, S., Cremer, H., Ortaldo, J., Love, P., Kaiserlian, D., et Vivier, E. (2000). Combined natural killer cell and dendritic cell functional deficiency in KARAP/DAP12 loss-of-function mutant mice. *Immunity* 13, 355-364.
- Touret, N., Paroutis, P., Terebiznik, M., Harrison, R. E., Trombetta, S., Pypaert, M., Chow, A., Jiang, A., Shaw, J., Yip, C., et al. (2005). Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation. *Cell* 123, 157-170.
- Trigona, W. L., Porter, C. M., Horvath-Arcidiacono, J. A., Majumdar, A. S., et Bloom, E. T. (2007). Could heme-oxygenase-1 have a role in modulating the recipient immune response to embryonic stem cells? *Antioxid Redox Signal* 9, 751-6.
- Trombetta, E. S., Ebersold, M., Garrett, W., Pypaert, M., et Mellman, I. (2003). Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science* 299, 1400-1403.
- Tsai, S., Shameli, A., et Santamaria, P. (2008). CD8+ T cells in type 1 diabetes. *Adv Immunol* 100, 79-124.
- Tsai, S., Shameli, A., Yamanouchi, J., Clemente-Casares, X., Wang, J., Serra, P., Yang, Y., Medarova, Z., Moore, A., et Santamaria, P. (2010). Reversal of autoimmunity by boosting memory-like autoregulatory T cells. *Immunity* 32, 568-580.
- Tsoyi, K., Ha, Y. M., Kim, Y. M., Lee, Y. S., Kim, H. J., Kim, H. J., Seo, H. G., Lee, J. H., et Chang, K. C. (2009). Activation of PPAR-gamma by carbon monoxide from CORM-2 leads to the inhibition of iNOS but not COX-2 expression in LPS-stimulated macrophages. *Inflammation* 32, 364-371.
- Tsuchihashi, S., Zhai, Y., Bo, Q., Busuttil, R. W., et Kupiec-Weglinski, J. W. (2007). Heme oxygenase-1 mediated cytoprotection against liver ischemia and reperfusion injury: inhibition of type-1 interferon signaling. *Transplantation* 83, 1628-34.
- Tsuchihashi, S., Zhai, Y., Fondevila, C., Busuttil, R. W., et Kupiec-Weglinski, J. W. (2005). HO-1 upregulation suppresses type 1 IFN pathway in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc* 37, 1677-8.
- Tuettenberg, A., Huter, E., Hubo, M., Horn, J., Knop, J., Grimbacher, B., Kroczeck, R. A., Stoll, S., et Jonuleit, H. (2009). The role of ICOS in directing T cell responses: ICOS-dependent induction of T cell anergy by tolerogenic dendritic cells. *J. Immunol* 182, 3349-3356.
- Tzima, S., Victoratos, P., Kranidioti, K., Alexiou, M., et Kollias, G. (2009). Myeloid heme oxygenase-1 regulates innate immunity and autoimmunity by modulating IFN-beta production. *J Exp Med* 206, 1167-79.
- Uematsu, S., Fujimoto, K., Jang, M. H., Yang, B., Jung, Y., Nishiyama, M., Sato, S., Tsujimura, T., Yamamoto, M., Yokota, Y., et al. (2008). Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat. Immunol* 9, 769-776.

- Ukkonen, P., Lewis, V., Marsh, M., Helenius, A., et Mellman, I. (1986). Transport of macrophage Fc receptors and Fc receptor-bound ligands to lysosomes. *J. Exp. Med* *163*, 952-971.
- Ullrich, R., Exner, M., Schillinger, M., Zuckermann, A., Raith, M., Dunkler, D., Horvat, R., Grimm, M., et Wagner, O. (2005). Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter and cardiac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant* *24*, 1600-5.
- Vareille, M., Rannou, F., Thelier, N., Glasser, A. L., de Sablet, T., Martin, C., et Gobert, A. P. (2008). Heme oxygenase-1 is a critical regulator of nitric oxide production in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-infected human enterocytes. *J Immunol* *180*, 5720-6.
- Vassileva, G., Soto, H., Zlotnik, A., Nakano, H., Kakiuchi, T., Hedrick, J. A., et Lira, S. A. (1999). The reduced expression of 6Ckine in the plt mouse results from the deletion of one of two 6Ckine genes. *J. Exp. Med* *190*, 1183-1188.
- Verginis, P., Li, H. S., et Carayanniotis, G. (2005). Tolerogenic semimature dendritic cells suppress experimental autoimmune thyroiditis by activation of thyroglobulin-specific CD4+CD25+ T cells. *J. Immunol* *174*, 7433-7439.
- Verhasselt, V., Vosters, O., Beuneu, C., Nicaise, C., Stordeur, P., et Goldman, M. (2004). Induction of FOXP3-expressing regulatory CD4pos T cells by human mature autologous dendritic cells. *Eur. J. Immunol* *34*, 762-772.
- Vignali, D. A. A., Collison, L. W., et Workman, C. J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol* *8*, 523-532.
- Villadangos, J. A., Bryant, R. A., Deussing, J., Driessen, C., Lennon-Duménil, A. M., Riese, R. J., Roth, W., Saftig, P., Shi, G. P., Chapman, H. A., et al. (1999). Proteases involved in MHC class II antigen presentation. *Immunol. Rev* *172*, 109-120.
- Villadangos, J. A., Cardoso, M., Steptoe, R. J., van Berkel, D., Pooley, J., Carbone, F. R., et Shortman, K. (2001). MHC class II expression is regulated in dendritic cells independently of invariant chain degradation. *Immunity* *14*, 739-749.
- Villadangos, J. A., et Schnorrer, P. (2007). Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat. Rev. Immunol* *7*, 543-555.
- Villadangos, J. A., et Young, L. (2008). Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* *29*, 352-361.
- Voisine, C., Hubert, F. X., Trinite, B., Heslan, M., et Josien, R. (2002). Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *J Immunol* *169*, 2284-91.
- Vremec, D., Lieschke, G. J., Dunn, A. R., Robb, L., Metcalf, D., et Shortman, K. (1997). The influence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell levels

- in mouse lymphoid organs. *Eur. J. Immunol* 27, 40-44.
- Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L., et Shortman, K. (2000). CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J. Immunol* 164, 2978-2986.
- Vulcano, M., Dusi, S., Lissandrini, D., Badolato, R., Mazzi, P., Riboldi, E., Borroni, E., Calleri, A., Donini, M., Plebani, A., et al. (2004). Toll receptor-mediated regulation of NADPH oxidase in human dendritic cells. *J Immunol* 173, 5749-56.
- Vyas, J. M., Van der Veen, A. G., et Ploegh, H. L. (2008). The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat. Rev. Immunol* 8, 607-618.
- Wagener, F. A., Eggert, A., Boerman, O. C., Oyen, W. J., Verhofstad, A., Abraham, N. G., Adema, G., van Kooyk, Y., de Witte, T., et Figdor, C. G. (2001). Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood* 98, 1802-11.
- Wagener, F. A., da Silva, J. L., Farley, T., de Witte, T., Kappas, A., et Abraham, N. G. (1999). Differential effects of heme oxygenase isoforms on heme mediation of endothelial intracellular adhesion molecule 1 expression. *J Pharmacol Exp Ther* 291, 416-23.
- Waithman, J., Allan, R. S., Kosaka, H., Azukizawa, H., Shortman, K., Lutz, M. B., Heath, W. R., Carbone, F. R., et Belz, G. T. (2007). Skin-derived dendritic cells can mediate deletional tolerance of class I-restricted self-reactive T cells. *J. Immunol* 179, 4535-4541.
- Wakkach, A., Fournier, N., Brun, V., Breitmayer, J. P., Cottrez, F., et Groux, H. (2003). Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* 18, 605-17.
- Walker, L. S. K., et Abbas, A. K. (2002). The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat. Rev. Immunol* 2, 11-19.
- Wang, B., Jiao, Z., Shao, X., Lu, L., Yang, N., Zhou, X., Xin, L., Zhou, Y., et Chou, K. (2010). Phenotypic alterations of dendritic cells are involved in suppressive activity of trichosanthin-induced CD8(+)/CD28(-) regulatory T cells. *J. Immunol* 185, 79-88.
- Wang, H., Lee, S. S., Dell'Agnello, C., Tchipashvili, V., d'Avila, J. C., Czismadia, E., Chin, B. Y., et Bach, F. H. (2006). Bilirubin can induce tolerance to islet allografts. *Endocrinology* 147, 762-8.
- Wang, H., Lee, S. S., Gao, W., Czismadia, E., McDaid, J., Ollinger, R., Soares, M. P., Yamashita, K., et Bach, F. H. (2005). Donor treatment with carbon monoxide can yield islet allograft survival and tolerance. *Diabetes* 54, 1400-6.
- Wang, J. H., Smolyar, A., Tan, K., Liu, J. H., Kim, M., Sun, Z. Y., Wagner, G., et Reinherz, E. L. (1999). Structure of a heterophilic adhesion complex between the human CD2 and CD58 (LFA-3) counterreceptors. *Cell* 97, 791-803.

- Wang, X. M., Kim, H. P., Nakahira, K., Ryter, S. W., et Choi, A. M. (2009). The heme oxygenase-1/carbon monoxide pathway suppresses TLR4 signaling by regulating the interaction of TLR4 with caveolin-1. *J Immunol* 182, 3809-18.
- Weiner, H. L. (2001). Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol. Rev* 182, 207-214.
- Wiktor-Jedrzejczak, W., Bartocci, A., Ferrante, A. W., Ahmed-Ansari, A., Sell, K. W., Pollard, J. W., et Stanley, E. R. (1990). Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 87, 4828-4832.
- Willis, D., Moore, A. R., et Willoughby, D. A. (2000). Heme oxygenase isoform expression in cellular and antibody-mediated models of acute inflammation in the rat. *J Pathol* 190, 627-34.
- Wilson, N. S., Behrens, G. M. N., Lundie, R. J., Smith, C. M., Waithman, J., Young, L., Forehan, S. P., Mount, A., Steptoe, R. J., Shortman, K. D., et al. (2006). Systemic activation of dendritic cells by Toll-like receptor ligands or malaria infection impairs cross-presentation and antiviral immunity. *Nat. Immunol* 7, 165-172.
- Wilson, N. S., et Villadangos, J. A. (2005). Regulation of antigen presentation and cross-presentation in the dendritic cell network: facts, hypothesis, and immunological implications. *Adv. Immunol* 86, 241-305.
- Winzler, C., Rovere, P., Rescigno, M., Granucci, F., Penna, G., Adorini, L., Zimmermann, V. S., Davoust, J., et Ricciardi-Castagnoli, P. (1997). Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J. Exp. Med* 185, 317-328.
- Xia, Z. W., Xu, L. Q., Zhong, W. W., Wei, J. J., Li, N. L., Shao, J., Li, Y. Z., Yu, S. C., et Zhang, Z. L. (2007). Heme oxygenase-1 attenuates ovalbumin-induced airway inflammation by up-regulation of foxp3 T-regulatory cells, interleukin-10, and membrane-bound transforming growth factor- 1. *Am J Pathol* 171, 1904-14.
- Xia, Z. W., Zhong, W. W., Xu, L. Q., Sun, J. L., Shen, Q. X., Wang, J. G., Shao, J., Li, Y. Z., et Yu, S. C. (2006). Heme oxygenase-1-mediated CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells suppress allergic airway inflammation. *J Immunol* 177, 5936-45.
- Xiang, S. D., Scholzen, A., Minigo, G., David, C., Apostolopoulos, V., Mottram, P. L., et Plebanski, M. (2006). Pathogen recognition and development of particulate vaccines: does size matter? *Methods* 40, 1-9.
- Xu, Y., Jagannath, C., Liu, X., Sharafkhaneh, A., Kolodziejaska, K. E., et Eissa, N. T. (2007). Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity* 27, 135-144.
- Yachie, A., Niida, Y., Wada, T., Igarashi, N., Kaneda, H., Toma, T., Ohta, K., Kasahara, Y., et Koizumi, S. (1999). Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in

- human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest* *103*, 129-35.
- Yamagami, S., Hamrah, P., Miyamoto, K., Miyazaki, D., Dekaris, I., Dawson, T., Lu, B., Gerard, C., et Dana, M. R. (2005). CCR5 chemokine receptor mediates recruitment of MHC class II-positive Langerhans cells in the mouse corneal epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* *46*, 1201-1207.
- Yamashita, K., Ollinger, R., McDaid, J., Sakahama, H., Wang, H., Tyagi, S., Csizmadia, E., Smith, N. R., Soares, M. P., et Bach, F. H. (2006). Heme oxygenase-1 is essential for and promotes tolerance to transplanted organs. *Faseb J*. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16473885.
- Yamazaki, S., Dudziak, D., Heidkamp, G. F., Fiorese, C., Bonito, A. J., Inaba, K., Nussenzweig, M. C., et Steinman, R. M. (2008). CD8+ CD205+ splenic dendritic cells are specialized to induce Foxp3+ regulatory T cells. *J. Immunol* *181*, 6923-6933.
- Yamazaki, S., Iyoda, T., Tarbell, K., Olson, K., Velinzon, K., Inaba, K., et Steinman, R. M. (2003). Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J. Exp. Med* *198*, 235-247.
- Yanagawa, Y., et Onoé, K. (2003). CCR7 ligands induce rapid endocytosis in mature dendritic cells with concomitant up-regulation of Cdc42 and Rac activities. *Blood* *101*, 4923-4929.
- Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J. F., Bannenberg, G. L., Serhan, C. N., Hayden, M. S., Hieny, S., Sutterwala, F. S., Flavell, R. A., Ghosh, S., et al. (2005). TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* *308*, 1626-1629.
- Yasui, Y., Nakamura, M., Onda, T., Uehara, T., Murata, S., Matsui, N., Fukuishi, N., Akagi, R., Suematsu, M., et Akagi, M. (2007). Heme oxygenase-1 inhibits cytokine production by activated mast cells. *Biochem Biophys Res Commun* *354*, 485-90.
- Yates, R. M., et Russell, D. G. (2005). Phagosome maturation proceeds independently of stimulation of toll-like receptors 2 and 4. *Immunity* *23*, 409-417.
- Ye, Y., Shibata, Y., Yun, C., Ron, D., et Rapoport, T. A. (2004). A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* *429*, 841-847.
- Ye, Z., Xu, S., Moyana, T., Yang, J., et Xiang, J. (2008). Defect of CD8+ memory T cells developed in absence of IL-12 priming for secondary expansion. *Cell. Mol. Immunol* *5*, 147-152.
- Yen, J., Khayrullina, T., et Ganea, D. (2008). PGE2-induced metalloproteinase-9 is essential for dendritic cell migration. *Blood* *111*, 260-270.
- Yet, S. F., Perrella, M. A., Layne, M. D., Hsieh, C. M., Maemura, K., Kobzik, L., Wiesel, P., Christou, H., Kourembanas, S., et Lee, M. E. (1999). Hypoxia induces severe right ventricular dilatation and infarction in heme oxygenase-1 null mice. *J Clin Invest* *103*,

R23-9.

- Yoneyama, H., Matsuno, K., Zhang, Y., Nishiwaki, T., Kitabatake, M., Ueha, S., Narumi, S., Morikawa, S., Ezaki, T., Lu, B., et al. (2004). Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules. *Int. Immunol* *16*, 915-928.
- York, I. A., Chang, S., Saric, T., Keys, J. A., Favreau, J. M., Goldberg, A. L., et Rock, K. L. (2002). The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat. Immunol* *3*, 1177-1184.
- You, S., Sleehoffer, G., Barriot, S., Bach, J., et Chatenoud, L. (2004). Unique role of CD4+CD62L+ regulatory T cells in the control of autoimmune diabetes in T cell receptor transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *101 Suppl 2*, 14580-14585.
- Young, L. J., Wilson, N. S., Schnorrer, P., Mount, A., Lundie, R. J., La Gruta, N. L., Crabb, B. S., Belz, G. T., Heath, W. R., et Villadangos, J. A. (2007). Dendritic cell preactivation impairs MHC class II presentation of vaccines and endogenous viral antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *104*, 17753-17758.
- Young, L. J., Wilson, N. S., Schnorrer, P., Proietto, A., ten Broeke, T., Matsuki, Y., Mount, A. M., Belz, G. T., O'Keeffe, M., Ohmura-Hoshino, M., et al. (2008). Differential MHC class II synthesis and ubiquitination confers distinct antigen-presenting properties on conventional and plasmacytoid dendritic cells. *Nat. Immunol* *9*, 1244-1252.
- Zaki, M. H., Fujii, S., Okamoto, T., Islam, S., Khan, S., Ahmed, K. A., Sawa, T., et Akaike, T. (2009). Cytoprotective function of heme oxygenase 1 induced by a nitrated cyclic nucleotide formed during murine salmonellosis. *J. Immunol* *182*, 3746-3756.
- Zelenay, S., Chora, A., Soares, M. P., et Demengeot, J. (2007). Heme oxygenase-1 is not required for mouse regulatory T cell development and function. *Int Immunol* *19*, 11-8.
- Zhai, Y., Shen, X. D., O'Connell, R., Gao, F., Lassman, C., Busuttill, R. W., Cheng, G., et Kupiec-Weglinski, J. W. (2004). Cutting edge: TLR4 activation mediates liver ischemia/reperfusion inflammatory response via IFN regulatory factor 3-dependent MyD88-independent pathway. *J Immunol* *173*, 7115-9.
- Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M. S., Greenblatt, M. B., Bussey, C., Flavell, R. A., et Ghosh, S. (2004). A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* *303*, 1522-1526.
- Zhang, Y., Harada, A., Wang, J. B., Zhang, Y. Y., Hashimoto, S., Naito, M., et Matsushima, K. (1998). Bifurcated dendritic cell differentiation in vitro from murine lineage phenotype-negative c-kit+ bone marrow hematopoietic progenitor cells. *Blood* *92*, 118-128.
- Zhou, L., Chong, M. M. W., et Littman, D. R. (2009). Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* *30*, 646-655.

- Zhu, Q., Egelston, C., Vivekanandhan, A., Uematsu, S., Akira, S., Klinman, D. M., Belyakov, I. M., et Berzofsky, J. A. (2008). Toll-like receptor ligands synergize through distinct dendritic cell pathways to induce T cell responses: Implications for vaccines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *105*, 16260-16265.
- Ziegler-Heitbrock, L. (2007). The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J. Leukoc. Biol* *81*, 584-592.
- Zuklys, S., Balciunaite, G., Agarwal, A., Fasler-Kan, E., Palmer, E., et Holländer, G. A. (2000). Normal thymic architecture and negative selection are associated with Aire expression, the gene defective in the autoimmune-polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED). *J. Immunol* *165*, 1976-1983.
- Zwickey, H. L., Unternaehrer, J. J., et Mellman, I. (2006). Presentation of self-antigens on MHC class II molecules during dendritic cell maturation. *Int. Immunol* *18*, 199-209.

ANNEXES

Annexe 1 : “Carbone Monoxide inhibits TLR-Induced Dendritic Cell Immunogenicity”

Séverine Rémy, Philippe Blancou, Laurent Tesson, Virginie Tardif, Régis Brion, Pierre Joseph Royer, Roberto Motterlini, Roberta Foresti, Marion Painchaut, Sylvie Pogu, Marc Grégoire, Jean-Marie Bach, Ignacio Anegon et Christine Chauveau.

Publié dans Journal of Immunology, 2009.

Carbon Monoxide Inhibits TLR-Induced Dendritic Cell Immunogenicity¹

Séverine Rémy,^{2,*†‡} Philippe Blancou,^{2§} Laurent Tesson,^{*†‡} Virginie Tardif,^{*†‡} Régis Brion,^{*†‡} Pierre Joseph Royer,[¶] Roberto Motterlini,^{||} Roberta Foresti,^{||} Marion Painchaut,[§] Sylvie Pogu,[§] Marc Gregoire,[¶] Jean Marie Bach,[§] Ignacio Anegón,^{3,4,*†‡} and Christine Chauveau^{3,4,*†‡}

Heme oxygenase-1 (HO-1) exerts its functions via the catabolism of heme into carbon monoxide (CO), Fe²⁺, and biliverdin, as well as by depletion of free heme. We have recently described that overexpression of HO-1 is associated with the tolerogenic capacity to dendritic cells (DCs) stimulated by LPS. In this study, we demonstrate that treatment of human monocyte-derived DCs with CO blocks TLR3 and 4-induced phenotypic maturation, secretion of proinflammatory cytokines, and alloreactive T cell proliferation, while preserving IL-10 production. Treatment of DCs with biliverdin, bilirubin, and deferoxamine or replenishing intracellular heme stores had no effect on DC maturation. HO-1 and CO inhibited LPS-induced activation of the IFN regulatory factor 3 pathway and their effects were independent of p38, ERK, and JNK MAPK. HO-1 and CO treatment also inhibited mouse DC maturation in vitro and mouse DC immunogenic properties in vivo, as shown by adoptive cell transfer in a transgenic model of induced diabetes. Thus, for the first time, our data show that CO treatment inhibits DC immunogenicity induced by TLR ligands and that blockade of IFN regulatory factor 3 is associated with this effect. *The Journal of Immunology*, 2009, 182: 1877–1884.

Heme oxygenases are the rate-limiting enzymes in the catabolism of heme, yielding equimolar amounts of carbon monoxide (CO),⁵ free iron, and biliverdin (BV) (1), which is subsequently reduced into bilirubin (BL). Heme oxygenase 1 (HO-1), the inducible form of heme oxygenases, has protective effects in a variety of experimental inflammatory models (reviewed in Ref. 2). The physiological importance of HO-1 has been demonstrated in both mice and humans, where HO-1 deficiency resulted in a progressive and chronic inflammation and a reduced

cellular resistance to oxidative stress (3–5). Induction of HO-1 expression by pharmacological activators or gene transfer have therapeutic effects in a variety of conditions or disorders involving inflammation and immune responses, including organ transplantation and autoimmunity (6–12). In several models, CO mimics the effects of HO-1 (reviewed in Ref. 13), indicating that HO-1 acts via the generation of CO. However, other end products of HO-1 activity, such as BV (14), free iron depletion by increased H chain ferritin expression (15), or cellular efflux pumps (16), or heme depletion (17) can also mediate the effects of HO-1.

Dendritic cells (DCs) play a major role in the initiation and regulation of the immune response. They have distinct stages of cell development, activation, and maturation and have the potential to induce both immunity and tolerance (reviewed in Ref. 18). In the absence of inflammation, immature DCs (iDCs) located in peripheral tissues continuously capture innocuous and cell-associated self-Ags and migrate to draining lymph nodes where they can induce tolerance (19). In the presence of danger and TLR signals, DCs mature, acquiring the ability to stimulate differentiation of naive T cells into effector cells. In certain conditions, phenotypically mature DCs have tolerogenic functions (18).

We previously showed that human and rat iDCs express HO-1, that this expression is restricted to certain DC populations, and that HO-1 expression drastically decreases upon DC maturation (20). We and others have demonstrated that overexpression of HO-1 in DCs inhibits their LPS-induced maturation and proinflammatory functions (20, 21), and it has been recently demonstrated that HO-1 expression in mouse DCs modulates the suppressive capacity of regulatory T cells (22). However, nothing is known regarding the role of the end products of heme degradation on DC functions.

In this study, we demonstrate that CO is the only end product capable of inhibiting LPS-induced DC phenotypic maturation, secretion of proinflammatory cytokines, and induction of alloreactive T cell proliferation, while preserving their production of IL-10. HO-1 and CO also inhibit proinflammatory cytokine production by

*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 643, Nantes, France; †Centre Hospitalier Universitaire Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation-Urologie-Néphrologie, Nantes, France; ‡Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France; §Institut National de la Recherche Argonomique, Ecole Nationale Vétérinaire, Université de Nantes, France; ¶Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 601, Nantes, France; and ||Department of Surgical Research, Vascular Biology Unit, Northwick Park Institute for Medical Research, Harrow, United Kingdom

Received for publication July 24, 2008. Accepted for publication December 11, 2008.

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

¹This project was funded by the Fondation Progreffe, Roche Organ Transplantation Research Foundation Grant 936864657 (to I.A.), and the ImmunIntervention et Biothérapies network funded by the Région Pays de la Loire through the Core Facility Research and Development for Clinical Transfer.

²S.R. and P.B. contributed equally to this work.

³I.A. and C.C. share senior authorship.

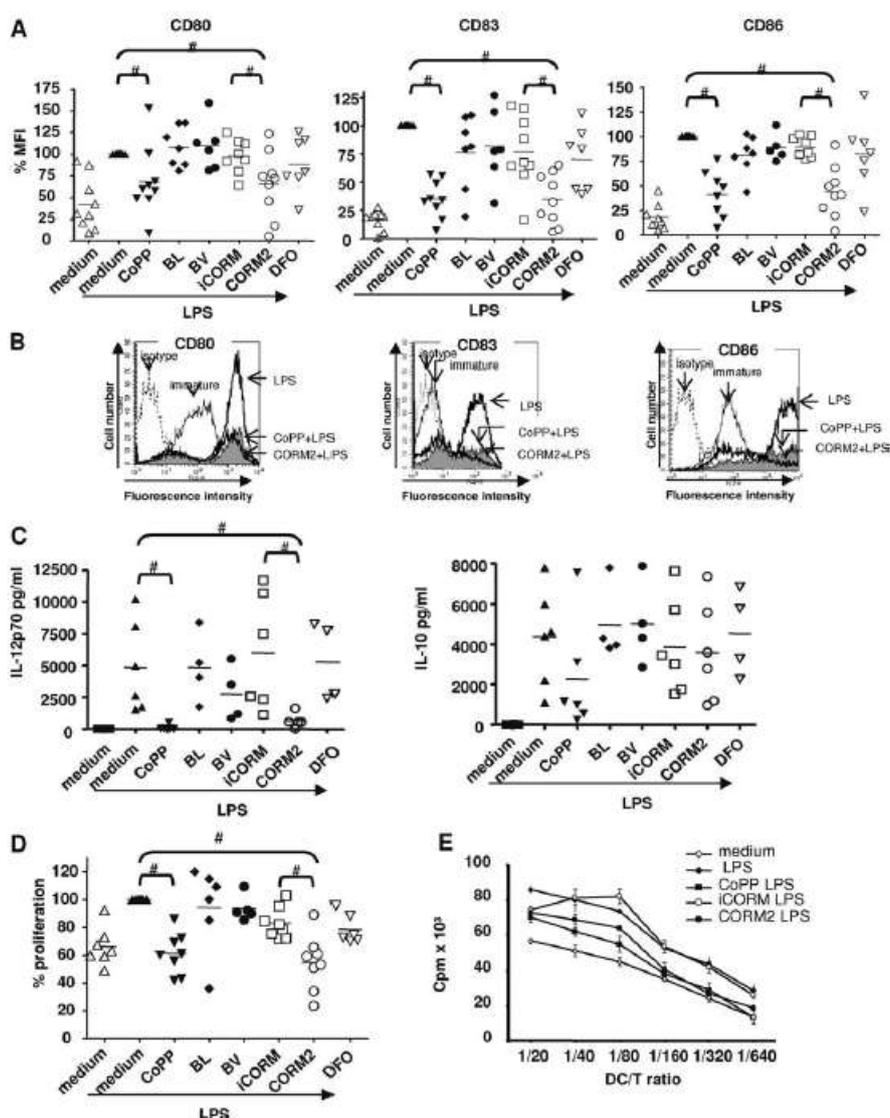
⁴Address correspondence and reprint requests to Dr. Ignacio Anegón and Dr. Christine Chauveau, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 643, Centre Hospitalier Régional Universitaire, Nantes, 30 boulevard Jean Monnet, 44093 Nantes, France. E-mail addresses: ianegon@nantes.inserm.fr and chauveau@nantes.inserm.fr

⁵Abbreviations used in this paper: CO, carbon monoxide; DC, dendritic cell; iDC, immature DC; HO-1, heme oxygenase 1; IRF-3, IFN regulatory factor 3; HA, hemagglutinin; CoPP, cobalt protoporphyrin; MnPP, manganese protoporphyrin; CORM2, tricarbonyldichlororuthenium(II) dimer; iCORM, inactive form of CORM2; BV, biliverdin; BL, bilirubin; DFO, deferoxamine; poly(I:C), polyinosinic:polycytidylic acid; [³H]Td, [³H]thymidine; TRIF, TIR domain adaptor-inducing IFN.

Copyright © 2009 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/09/\$2.00

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0802436

FIGURE 1. CO renders DCs refractory to LPS-induced maturation. **A**, FACS analysis showing the phenotype of human DCs treated or not with CoPP, BV, BL, iCORM, CORM2, or DFO and stimulated with LPS. Expression of cell markers was considered to be maximal (100%) for LPS treatment. Each point corresponds to an individual experiment and the horizontal bar corresponds to the mean. #, $p < 0.05$. **B**, Histograms for FACS analysis of CD80, CD83, and CD86 expression for one of six to nine representative experiments. **C**, Production of IL-12 p70 and IL-10 in the supernatants was assessed by ELISA. #, $p < 0.05$. **D**, Proliferation of allogeneic T cells induced by 4 days of culture with human DCs (ratio 1:20). Proliferation induced by LPS-treated DCs was considered to be maximal (from 19,500 to 73,000 cpm). #, $p < 0.05$. **E**, One representative MLR experiment of five to eight experiments is shown. Results are expressed as means \pm SD of triplicate values after subtraction of spontaneous [3 H]TdR. #, $p < 0.05$ compared with LPS-treated DCs.



DCs induced by the TLR3 ligand. An analysis of the intracellular signaling pathways showed that HO-1 and CO inhibit the phosphorylation of IFN regulatory factor 3 (IRF-3). Importantly, transgenic mice expressing influenza virus hemagglutinin (HA) in pancreatic β cells and adoptively transferred with transgenic anti-HA CD8⁺ T cells did not develop diabetes when immunized with HO-1-overexpressing or CO-treated HA peptide-loaded DCs, whereas mice immunized with control HA peptide-loaded DCs did. These provided evidence that HO-1-overexpressing or CO-treated HA peptide-loaded DCs display impaired immunogenic functions *in vivo*.

Materials and Methods

Mice

The Ins-HA-transgenic mice (23) express HA of the influenza virus in pancreatic islets and the TCR-HA₅₁₂₋₅₂₀ transgenic mice (24) express a TCR-specific for the H-2K^d-restricted (IYSTVASSL) epitope of HA (Département de Cryopréservation, Typage, et Archivage Animal Orléans, France). All animal experiments were performed under specific pathogen-free conditions in accordance with the European Union Guidelines.

Cell preparation, culture, and treatments

Mouse DCs. Bone marrow cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10 ng/ml of supernatant from COS cells transfected with murine GM-CSF cDNA, 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, and 50 mM 2-ME (all from Sigma-Aldrich). At day 8, a positive selection of iDCs (purity >95%) was performed by magnetic cell sorting using mouse CD11c microbeads (Miltenyi Biotec).

Human monocyte-derived DCs. Human PBMC were isolated following standard procedures from leukapheresis samples of healthy donors following institutional-approved protocols (Etablissement Français du Sang, Nantes, France). Positive selection of monocytes (purity >90%) was performed by magnetic cell sorting using CD14 microbeads (Miltenyi Biotec). Monocytes were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin (all from Sigma-Aldrich), IL-4 (40 ng/ml; R&D systems), and GM-CSF (1000 IU/ml; Gentaur). At day 5,

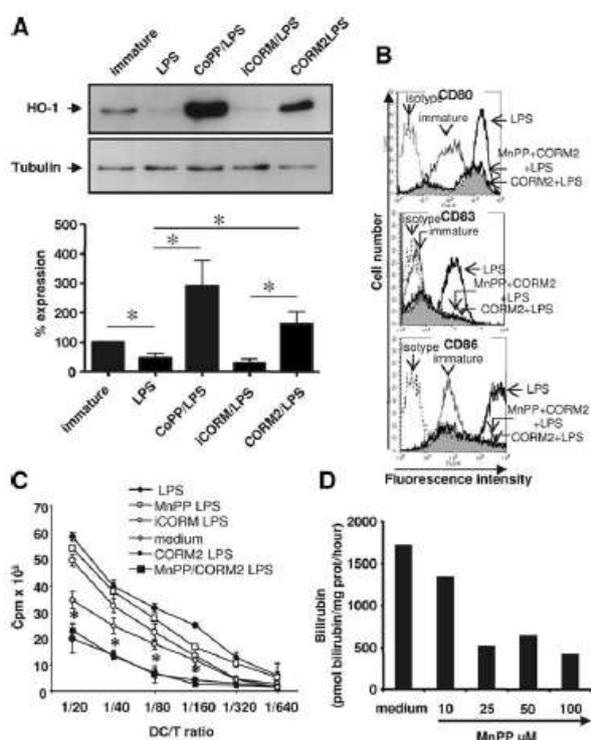


FIGURE 2. CO renders DCs refractory to LPS-induced maturation independently of HO-1 induction. *A, upper*, Western blot analysis showing HO-1 expression in human DCs treated or not with CoPP, iCORM, or CORM2 and stimulated or not with LPS. Anti- β -tubulin Ab was used as a loading control. *A, lower*, Bar graphs show densitometry analysis \pm SD of HO-1 Western blot signals after normalization with β -tubulin. Data are the mean \pm SD of six independent experiments. *, $p < 0.05$. *B*, FACS analysis showing the phenotype of human DCs treated or not with CORM2 and/or MnPP and stimulated with LPS. Similar results were obtained in three independent experiments. *C*, DCs were treated or not with iCORM, CORM2, and/or MnPP and stimulated or not with LPS. Thereafter, DCs were cultured with allogeneic T cells at different ratios for 4 days and proliferating T cells were labeled with [³H]TdR. Results are shown as means \pm SD of triplicate values after subtraction of spontaneous [³H]TdR. *, $p < 0.005$ compared with iCORM plus LPS-treated DCs. Similar results were obtained in three independent experiments. *D*, The concentrations of MnPP used in this study inhibit HO-1 activity. Rat NR8383 macrophages which spontaneously express a high level of HO-1 were treated or not with different doses of MnPP for 24 h. HO activity was assessed by BL production in microsomal pellets of the cells. BL production was measured spectrophotometrically and expressed as picomoles of BL per milligram of protein per hour (453 nm = 40 mM to 1 cm⁻¹).

iDCs were harvested and cultured using the above described medium.

Treatment of DCs. iDCs were treated with cobalt protoporphyrin (CoPP), an inducer of HO-1, as previously described (20). Briefly, iDCs were pulsed for 2 h with 50 μ M CoPP, washed, and then cultured with TLR ligands. iDCs were also treated 2 h before addition of TLR ligands with the HO-1 inhibitor manganese protoporphyrin (MnPP; 50 μ M, also during TLR stimulation) (all porphyrins were protected from light at all times and were from Frontier Scientific), tricarbonyldichlororuthenium (II) dimer ([Ru(CO)₃Cl₂]₂, CORM2; 30 μ M for human DCs, 100 μ M for mouse DCs; Sigma-Aldrich), and the inactive form of CORM2 (iCORM, (Ru(DMSO)₄Cl₂)) with the only substitution of carbonyl groups (released as CO) by DMSO (25), bilirubin (BL, 10 μ M;

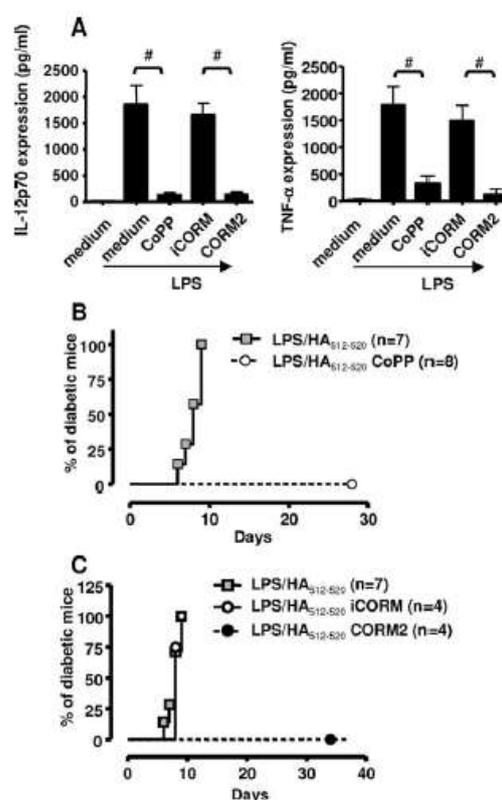


FIGURE 3. HO-1 overexpression and CO treatment inhibit maturation of mouse DCs in vitro and immunogenicity in vivo. *A*, Production of IL-12 p70 and TNF- α in the supernatants of mouse bone marrow-derived DCs, treated or not with CoPP, iCORM, or CORM2 and then stimulated with LPS for 24 h, was assessed by ELISA. Data presented are mean \pm SD of 4–13 independent experiments for IL-12p70 and of three independent experiments for TNF- α . #, $p < 0.05$. *B* and *C*, Diabetes incidence after transfer of LPS-treated, LPS plus CoPP-treated, and after transfer of LPS plus iCORM-treated and LPS plus CORM2-treated HA-loaded DCs. $n = 4$ –8 for each group from two experiments performed separately.

Calbiochem), BV (10 μ M; MP Biomedical), the iron chelator deferoxamine mesylate (DFO, 400 μ M; Sigma-Aldrich), JNK inhibitor SP600125 (10 μ M), p38 MAPK inhibitor pyridinyl imidazole SB203580, (20 μ M), and ERK inhibitor PD98059 (10 μ M) (all from Calbiochem). Treated DCs were then cultured for 24 h with LPS (1 μ g/ml, *Escherichia coli* 0111:B4; Sigma-Aldrich), or polyinosinic:polycytidylic acid (poly(I:C), 100 μ g/ml; Sigma-Aldrich). For diabetes induction, DCs were pulsed for 2 h with HA₅₁₂₋₅₂₀ peptide (5 μ M; Sigma-Aldrich) and LPS (1 μ g/ml; Sigma-Aldrich).

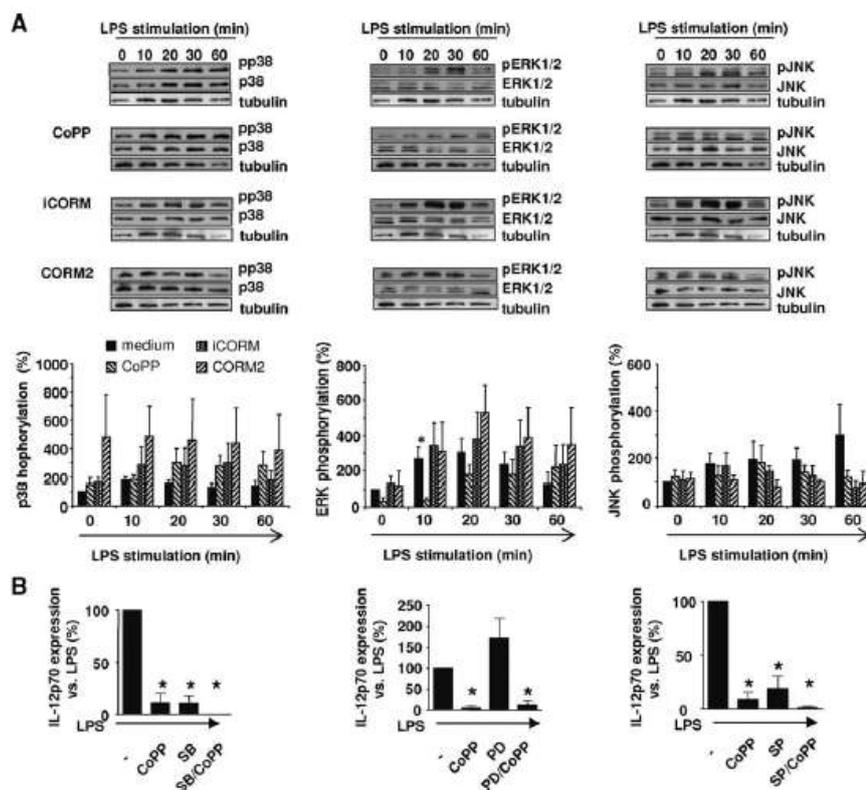
Mixed Lymphocyte Reaction

DCs were cultured in triplicate with 10⁵ allogeneic PBL as previously described (20). Proliferation was determined 4 days later by uptake of [³H]thymidine (1 μ Ci/well; Amersham Biosciences) during the last 8 h of culture.

Cell extracts and Western blot analysis

Western blot analysis was performed as previously described (7). Briefly, cell protein extracts were electrophoresed on a SDS-polyacrylamide gel and blotted. Membranes were blocked and incubated with Abs. HO-1 was detected using a rabbit anti-HO-1 Ab (StressGen). Total and activated/phosphorylated forms of extracellular signal-regulated kinases (ERK1 and

FIGURE 4. HO-1 and CO render DCs refractory to LPS-induced maturation independently of the p38 MAPK, ERK, and JNK pathways. **A**, Human DCs were treated or not with CoPP, iCORM, or CORM2 and stimulated with LPS for 10, 20, 30, and 60 min. Western blots show representative experiments for p38, ERK, and JNK MAPK phosphorylated or not. Anti- β -tubulin Ab was used as a loading control. Bar graphs show densitometry analysis \pm SD of MAPK phosphorylation signals after normalization with the total expression of JNK and ERK for the respective phosphorylated forms and with β -tubulin for phosphorylated p38 since we observed increased expression of total p38 following LPS treatment. Data are the mean \pm SD of three to five independent experiments. *, $p < 0.05$. **B**, Human DCs were treated or not with CoPP and/or with SB203580 (SB), PD98059 (PD), or SP600125 (SP) inhibitors of p38 MAPK, ERK, and JNK, respectively, and then stimulated with LPS for 24 h. Secretion of IL-12p70 was considered to be maximal for LPS treatment (from 1,743 to 26,100 pg/ml). Data presented are the mean \pm SD of three to five independent experiments. *, $p < 0.05$.



2), c-Jun NH₂-terminal kinases (JNK1–3), and p38 MAPK and the phosphorylated forms of I κ B α and IRF-3 were detected using rabbit Abs. Cell β -tubulin was detected using a mouse anti- β -tubulin Ab (Calbiochem). Membranes were then incubated with HRP-labeled secondary Abs (Jackson ImmunoResearch Laboratories) and detection was performed by ECL (Amersham Biosciences). Blots were analyzed by densitometry following nonsaturating exposure.

NF- κ B luciferase reporter assay

Human DCs were transduced at 400:1 multiplicity of infection with a recombinant replication-deficient adenovirus containing a NF- κ B promoter luciferase reporter gene provided by Dr. P. McCray (University of Iowa). DCs were cultured for 24 h before being treated or not with CoPP, iCORM, or CORM2 and LPS stimulated for 6 h. Then, the cells were washed and lysed in luciferase cell lysis buffer (Promega). Luciferase activity was measured from cell lysates with VICTOR2 (PerkinElmer) using a luciferase assay system (Promega).

Flow cytometry

DCs were stained with anti-CD80, anti-CD83, and anti-CD86 PE-conjugated mAbs (Immunotech). Staining was assessed on viable DCs excluding TO-PRO-3 iodide or 7-actinomycin D using a FACSCalibur flow cytometer and CellQuest software (BD Biosciences). PE-labeled mouse anti-IgG1 Ab (Immunotech) was used as a negative control.

Cytokine measurement

Human ELISA kits were used for IL-12p70, p40, IL-23, TNF- α , IL-10, and IFN-inducible protein 10 (IP-10; BD Pharmingen), and IFN- β (PBL Biomedical Laboratories) and mouse ELISA kits were used for IL-12p70, TNF- α , and IP-10 (BD Pharmingen).

Diabetes induction

Six- to 8-wk-old Ins-HA mice were injected i.v. with 0.5×10^6 CD8⁺ T cells (purity >95%) isolated from HA₅₁₂₋₅₂₀ TCR-transgenic mice (24) (Miltenyi Biotec). Twenty-four hours later, mice were injected i.v. with 15,000 HA-loaded LPS-matured DCs. Diabetes was monitored using Clin-

istix urinalysis strips (Bayer). Mice were considered diabetic when the glucose concentration was above 5.5 mmol/L.

Statistical analysis

Statistical significance was assessed using the nonparametric one-way ANOVA test with a Tukey post test. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

CO inhibits DC maturation and function in vitro

We previously showed that HO-1 induction in human DCs partially inhibits LPS-induced maturation (20). In this study, we investigated the role of the heme degradation products in this effect. Human iDCs were treated with CORM2 (25), BL, BV, or DFO. We induced HO-1 in DCs using CoPP, an inducer of HO-1 (2), and we used an inactive form of CORM2 (iCORM) (25) as a negative control of CO treatment. Treatments were adapted to avoid toxicity on DCs (data not shown). As for CoPP-treated cells or HO-1 gene transfer-treated DCs, CORM2-treated DCs were refractory to LPS-induced phenotypic and functional maturation (Fig. 1 and supplemental Fig. 1⁶). A significant inhibition of CD80, CD83, and CD86 cell surface expression was observed in CORM2-treated DCs compared with untreated or iCORM-treated cells incubated with LPS, whereas BL, BV, and DFO had no effect on DC maturation (Fig. 1, A and B). CORM2 treatment significantly decreased LPS induction of the proinflammatory cytokine IL-12p70 (Fig. 1C), IL-12p40, and IL-23, but had almost no effect on TNF- α (supplemental Fig. 2). The expression of the anti-inflammatory

⁶ The online version of this article contains supplemental material.

cytokine IL-10 was preserved (Fig. 1C). BL, BV, and DFO treatments, on the other hand, did not influence the LPS-induced expression of IL-12p70 or IL-10 (Fig. 1C). Treatment with CoPP, iCORM, CORM2, BL, BV, and DFO alone (no LPS) did not induce DCs to secrete cytokines (data not shown). CORM2 plus LPS-treated DCs were weaker stimulators of allogeneic T cells compared with control LPS-treated DCs and iCORM plus LPS-treated DCs (Fig. 1, D and E). BL, BV, and DFO treatments had no effect on T cell proliferation induced by allogeneic DCs (Fig. 1D).

Given that CO is known to up-regulate HO-1 expression not only when administered as a gas (26, 27), but also as CORM2 (28–30), we assessed whether CORM2 could induce HO-1 expression in human DCs. Compared with LPS, CORM2 moderately increased HO-1 levels, whereas iCORM had no effect (Fig. 2A). The reduction on CD80, CD83, and CD86 expression (Fig. 2B) and on the allostimulatory capacity of CORM2-treated DCs (Fig. 2C) were preserved in the presence of the selective HO-1 inhibitors MnPP (at concentrations that inhibited HO-1 activity, Fig. 2D) and tin protoporphyrin (supplemental Fig. 3). Altogether, these results demonstrate that exogenous CO mimicked the effect of HO-1 induction on DC maturation and function, independently of HO-1 induction, suggesting that CO generated by HO-1 activity largely contributes to the actions of HO-1 on DCs.

HO-1 expression and CO treatment inhibit DC immunogenicity in a murine *in vivo* model

To investigate whether HO-1 overexpression and CO treatment inhibit DC functions *in vivo*, we used a transgenic mouse model in which diabetes is induced by DCs. We first determined whether maturation of mouse DCs was also inhibited by induction of HO-1 or CO treatment. Treatments were used at concentrations nontoxic to mouse DCs as determined by flow cytometric analysis of physical parameters and 7-aminoactinomycin D staining (data not shown). In contrast to human and rat DCs (Ref. 20 and this manuscript), CoPP-induced HO-1 overexpression or CORM2 treatment had no effect on the LPS-induced CD80, CD86, and CD40 surface expression in mouse BALB/c and C57BL/6 DCs compared with untreated or iCORM-treated cells incubated with LPS (supplemental Fig. 4). In contrast, LPS-induced expression of the proinflammatory cytokines IL-12p70 and TNF- α was significantly decreased by CoPP and CORM2 treatment (Fig. 3A).

To analyze the effect of HO-1 overexpression and CO treatment on Ag presentation *in vivo*, we used a model of induced autoimmune diabetes in transgenic mice. Ins-HA transgenic mice adoptively transferred with naive anti-HA CD8⁺ T cells developed diabetes in 6–9 days, only when immunized with both matured and HA peptide-loaded DCs and not when DCs were either immature or not loaded with HA peptide (supplemental Fig. 5). Immature mouse DCs were treated with CoPP, iCORM, CORM2, or medium alone, then stimulated with LPS, loaded with HA peptides, and adoptively transferred to recipient mice. Our results show that CoPP- and CORM2-treated DCs (Fig. 3, B and C) or after HO-1 gene transfer (supplemental Fig. 6) are not capable of inducing diabetes, whereas mice injected with HA-loaded control DCs or DCs treated with control iCORM develop diabetes 6–9 days after DC transfer. Altogether, these results show that *in vitro* treatment of mouse DCs with HO-1 or CO inhibits not only LPS-induced maturation *in vitro* but also their immunogenic capacities *in vivo*.

HO-1 and CO inhibition of human DC maturation is independent of the MAPK signaling pathways

LPS has been shown to activate multiple signaling pathways in DCs, including the ERK, the JNK, and the p38 MAPK pathways (31) and this was confirmed in four of five of our experiments (Fig.

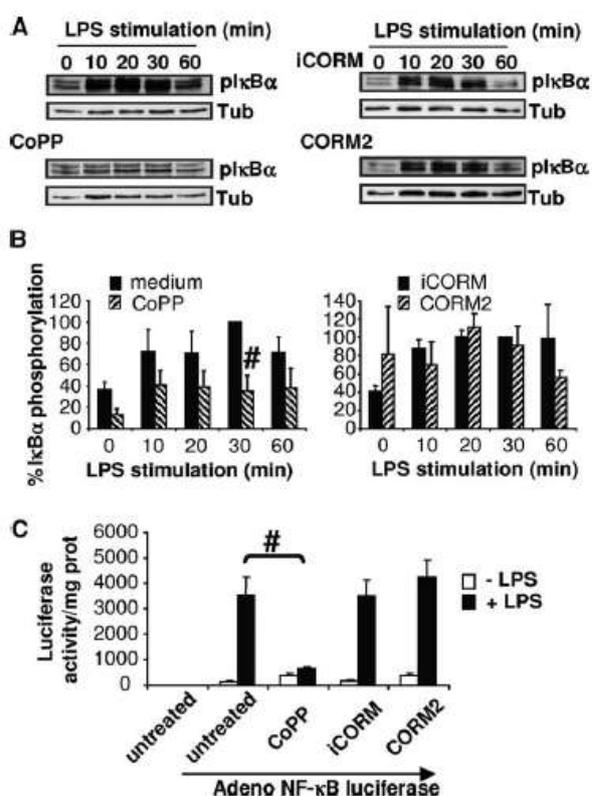


FIGURE 5. Action of HO-1 and CO on the NF- κ B signaling pathway. **A**, Western blot analysis showing the phosphorylation of I κ B α in human DCs treated or not with CoPP, iCORM, or CORM2 and then stimulated with LPS for 10, 20, 30, and 60 min. Anti- β -tubulin Ab was used as a loading control. Similar results were obtained in three independent experiments. **B**, Bar graphs show densitometry analysis \pm SD of I κ B α phosphorylation signals after normalization with β -tubulin expression. Data presented are the mean \pm SD of three independent experiments. *, $p < 0.05$. **C**, Human DCs were transfected with a recombinant adenovirus containing a NF- κ B luciferase reporter gene, cultured for 24 h, treated or not with CoPP, iCORM, or CORM2 and stimulated with LPS for 6 h. Cells were lysed and luciferase activity was measured. Similar results were obtained in three independent experiments. #, $p < 0.05$.

4A). Phosphorylation of p38 MAPK and JNK were not significantly modified following HO-1 induction or CORM2 treatment compared with control untreated or iCORM-treated conditions (Fig. 4A). ERK phosphorylation was significantly inhibited by CoPP only at 10 min but not by CORM2 (Fig. 4A). To further analyze the implication of these pathways in the effects of HO-1 on DC maturation, DCs were pretreated with inhibitors of P38 MAPK, ERK, and JNK, followed by CoPP and LPS treatment. Inhibition of the p38 MAPK or of the JNK pathway largely inhibited IL-12p70 secretion, as already described (31), and when associated to HO-1 induction IL-12p70 secretion was totally abolished (Fig. 4B), showing an additive effect of both treatments and confirming that the p38 or JNK MAPK pathways are not involved in the effects of HO-1 on DC maturation. Inhibition of the ERK pathway (confirmed by Western blot analysis, data not shown) slightly increased the LPS induced IL-12p70 secretion, as previously described (31), and, when combined with HO-1 expression, did not reverse the inhibition of IL-12p70 secretion observed with HO-1 alone (Fig. 4B), indicating that the ERK pathway is not implicated in the inhibitory effects of HO-1 on DC maturation.

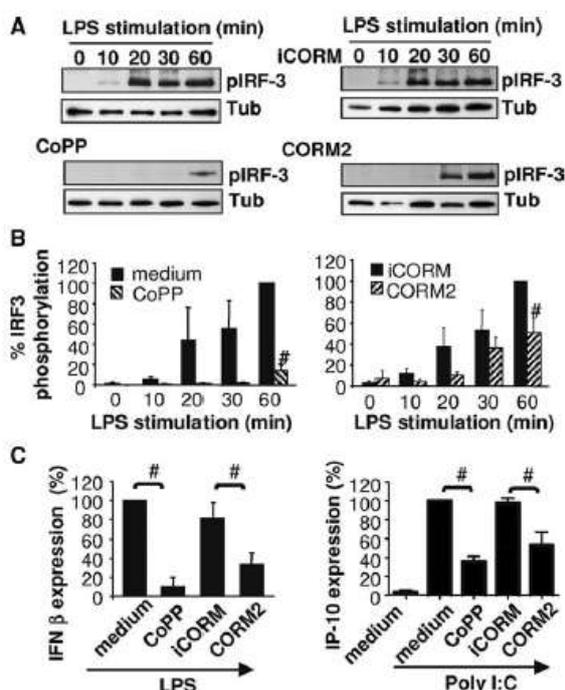


FIGURE 6. HO-1 and CO inhibit IRF-3 phosphorylation. **A**, Western blot analysis showing IRF-3 phosphorylation in human DCs treated or not with CoPP, iCORM, or CORM2 and then stimulated with LPS for 10, 20, 30, and 60 min. Anti- β -tubulin Ab was used as a loading control. Similar results were obtained in four independent experiments. **B**, Bar graphs show densitometry analysis \pm SD of IRF-3 phosphorylation signals after normalization with tubulin. Phosphorylation of IRF-3 was considered to be maximal (100%) for 60 min of LPS treatment and 60 min of iCORM plus LPS treatment. **C**, IFN- β and IP-10 secretion by human DCs treated or not with CoPP, iCORM, or CORM2 and then stimulated with LPS or poly(I:C) for 24 h. Secretion was considered to be maximal for LPS (from 9 to 131 pg/ml IFN- β) and for poly(I:C) treatment (from 16,500 to 27,400 pg/ml IP-10). Data presented are the mean \pm SD of seven independent experiments. #, $p < 0.05$.

HO-1 but not CO inhibits LPS-induced NF- κ B activation in human DCs

The transcription factor NF- κ B plays a central role in the LPS-induced maturation of human DCs (32). NF- κ B is present in the cytosol as an inactive form bound to the inhibitory I κ B α protein. Phosphorylation and subsequent degradation of I κ B α result in the release and nuclear translocation of NF- κ B (33). CoPP-induced HO-1 overexpression in DCs significantly inhibited the LPS-induced phosphorylation of I κ B α . In contrast, CORM2 did not inhibit LPS-induced I κ B α phosphorylation (Fig. 5, A and B). These results were confirmed by experiments using an NF- κ B luciferase reporter assay in which the activation of NF- κ B is blocked by induction of HO-1 expression but not by CORM2 treatment (Fig. 5C).

HO-1 and CO inhibits LPS-induced IRF-3 phosphorylation in human DCs

LPS-induced TLR4 activation is also associated with TIR domain-containing adaptor-inducing IFN (TRIF) recruitment, which results in nuclear translocation of IRF-3, a critical transcription factor for IFN- α and β gene expression (34, 35). The IRF-3 pathway is also activated by TLR3 and TLR3 is unique in that it does not use the MyD88 pathway but only recruits TRIF (36). IRF-3 is found in the cytoplasm as an inactive monomer and becomes ac-

tivated by phosphorylation, followed by dimerization and translocation to the nucleus (37). Western blot analysis showed that LPS treatment induced an increase in phosphorylated IRF-3 (Fig. 6, A and B), which was significantly inhibited by CoPP-induced HO-1 expression and by CORM2 treatment (Fig. 6, A and B). To confirm the effect of HO-1 and CO on the IRF-3 pathway, we analyzed the expression of IFN- β and of the chemokine IP-10, which are induced upon IRF-3 activation by LPS treatment or TLR3 activation with poly(I:C). LPS-induced IFN- β and IP-10 production was significantly reduced with CoPP-induced HO-1 expression or CORM2 treatment (Fig. 6C). Altogether, these results demonstrate that HO-1 and CO inhibit LPS and poly(I:C)-mediated IRF-3 activation in DCs.

Discussion

The actions of HO-1 are mediated by the end products of heme metabolism. BL and BV are antioxidant (38) and also inhibit complement activation (39), T cell proliferation, IL-2 production, and cellular cytotoxicity (40). Free iron, despite its prooxidant effects, induces an over-expression of ferritin, which in turn has strong antioxidant effects through depletion of free iron and also by other less-characterized effects that result in induction of tolerogenic DCs (41). CO inhibits the production of TNF- α , IL-1 β , and MIP-1 β by LPS-activated mouse macrophages and increases IL-10 expression (42). In addition, CO inhibits T cell proliferation (43). Moreover, we (17) and others (44) have shown that heme depletion due to HO-1 activity also mediates the actions of HO-1.

We (20) and others (21) demonstrated that CoPP-induced HO-1 and HO-1 gene transfer in human and rat DCs inhibited LPS-induced phenotypic maturation and proinflammatory cytokine expression, whereas the expression of IL-10 was preserved. These DCs overexpressing HO-1 also displayed a diminished ability to stimulate allogeneic T cell proliferation (20, 21). HO-1 expression in mouse DCs was recently described to modulate the suppressive capacity of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (22). We now show that CO treatment blocked the LPS-induced phenotypic maturation of human DCs in addition to reducing the expression of the proinflammatory cytokines and the capacity of DCs to stimulate alloreactive T cell proliferation. In contrast, treatment of human DCs with BL, BV, or DFO or replenishing heme cellular stores (data not shown) had no effect on DC phenotype or cytokine production. However, our results do not exclude the possibility that BL, BV, or iron metabolism has additive or synergistic effects with CO on DCs. On mouse DCs, CoPP-induced HO-1 expression and CO treatment inhibited the expression of proinflammatory cytokines but, as recently described (12) and in contrast with human and rat DCs, we could not detect a significant effect of HO-1 on the expression of phenotypic maturation markers.

Other groups have also analyzed the effect of HO-1 on DC biology using CoPP (12, 21, 45), a classical compound to induce HO-1 in many other cell types (46). It has recently been described that DCs treated with CoPP up-regulate HO-1 and Stat-3 and that is the last molecule, the one responsible for the effect of CoPP using mouse DCs, but unfortunately this point was not analyzed using human and rat DCs and therefore it is difficult to conclude definitively (47). We confirmed the results obtained with CoPP in human but also mouse DCs using HO-1 gene transfer and other groups did it in DCs using gene transfer of HO-1 (21) or HO-1-deficient mice (12). Therefore, HO-1 and eventually CO act in DCs through downstream mechanisms that could include Stat-3, as has been described in HO-1 in endothelial cells (48). To add a level of complexity, Stat-3 has been described as inducing HO-1 (49); therefore, a positive feedback mechanism may exist between Stat-3 and HO-1.

To determine whether in vitro HO-1 overexpression in DCs or CO treatment of DCs acts on DC functions in vivo, we used a transgenic mouse diabetes model in which cytotoxic T cell effector functions were induced by HA-loaded DCs leading to diabetes in Ins-HA-transgenic mice. In contrast, mice receiving DCs that had been treated with CoPP or CO before being matured and loaded with HA did not develop diabetes. These results demonstrate that HO-1 overexpression and CO treatment inhibited the immunogenicity of matured DCs responsible for the activation of CD8⁺ T effector cells and final induction of diabetes.

Previously published data described that overexpression of HO-1 or in vivo systemic CO treatment attenuated the progression of diabetes in spontaneously autoimmune diabetic NOD mice (10, 11). These results and ours in the model of induced autoimmune diabetes support the use of ex vivo CO-treated DCs loaded with β cell autoantigens to induce tolerance in NOD mice. The inhibition of CD8⁺ T cell responses in our induced diabetes model is in agreement with the inhibition of CD8⁺ T cell responses by HO-1 and CO systemic treatment very recently reported in models of experimental autoimmune encephalomyelitis and cerebral malaria (12, 50).

We demonstrate that HO-1 (20) and CO inhibit the production of cytokines critical for T cell responses. Secretion of IL-12p70 and IL-12p40 are strongly inhibited, whereas IL-10 was preserved. A decrease of IL-12 production and concomitant secretion of IL-10 has been shown to be involved in the induction of tolerance and anergy in T cells (51). Increased expression of HO-1 by mouse macrophages or treatment of these cells with CO inhibits the production of proinflammatory cytokines induced by LPS stimulation while preserving IL-10 secretion (42, 52), although IL-10 did not mediate the anti-inflammatory effects of HO-1 (42). Our results show that HO-1 and CO preserve IL-10 secretion in DCs but treatment with an anti-IL-10 Ab did not significantly reverse the inhibitory effect of HO-1 and CO on IL-12p70 secretion (supplemental Fig. 7), suggesting that HO-1 and CO inhibit DC maturation and function independently of IL-10.

ERK, JNK, and p38 MAPK signaling pathways have distinct roles in the maturation process of DCs and, in agreement with reported data obtained with LPS- or TNF- α -treated DCs (for review, see Ref. 31), we found that these pathways were rapidly and transiently activated in DCs by LPS. HO-1 and CO are known to increase p38 MAPK phosphorylation in macrophages and endothelial cells and to inhibit JNK phosphorylation in macrophages and ERK1/2 phosphorylation in vascular smooth muscle cells and T cells (for review, see Ref. 13). We did not detect any effect of HO-1 overexpression or CO on LPS-induced phosphorylation of p38 MAPK and JNK in DCs. In contrast, the LPS-induced phosphorylation of ERK was modestly inhibited by HO-1 overexpression in DCs, but the inhibition of the ERK pathway alone did not inhibit IL-12p70 secretion and did not reverse the inhibitory effect of HO-1 overexpression on the LPS-induced IL-12p70 secretion, suggesting that although the ERK pathway was inhibited by HO-1, it does not mediate the effect of HO-1 and HO-1-derived CO on DC maturation and functions. Increased cGMP have been described as a signaling transduction pathway induced by CO (13), but we did not observe an effect of this pathway in the inhibition of LPS-induced maturation of DCs treated with HO-1 or CO (data not shown).

Signaling through TLRs can be broadly categorized into two pathways, the MyD88- and the TRIF-dependant pathways. All TLRs, except TLR3, activate the MyD88 pathway, whereas TLR3 and TLR4 activate the TRIF pathway (53). The MyD88 and TRIF pathway commonly activate NF- κ B (34). IRF-3 activation by TRIF signaling is critical for LPS induction of IFN- β , IP-10, and

other chemokine genes (54). We noted that HO-1 inhibited the I κ B α phosphorylation and, thus, the subsequent activation of NF- κ B, whereas CO has no significant effect on the activation of the NF- κ B pathway. However, we observed a consistent and significant decrease in LPS-induced IL-12p70 and IL-12p40 secretion when DCs were treated with CO. Generation of the active IL-12p70 required the expression of both IL-12p40 and IL-12p35 subunits. TLR3 and TLR 4-induced IL-12p35 (55) and IL-12p40 (56) expression have been shown to be dependent on IRF-3 phosphorylation. In mouse macrophages, HO-1 and CO have been described to inhibit the LPS-induced phosphorylation of IRF-3, whereas TLR3-induced IRF3 activation was inhibited by HO-1 but not by CO (57). In human DCs, both HO-1 and CO inhibited not only LPS-induced IRF-3 activation but also TLR3-induced IRF-3 activation, as demonstrated by the inhibition of IP-10 secretion activated by poly(I:C). These effects on human DCs explain the inhibition of LPS-induced secretion of IL-12p70, reflecting the inhibition of IL12p35 and IL-12p40 expression. Whereas HO-1 inhibits TLR4-mediated IRF-3 activation in both human and mouse DCs, CO inhibits TLR3-induced IRF-3 activation in human but not mouse DCs. Other species differences were observed since HO-1 and CO inhibited human and rat DC phenotypic maturation but had no effect on that of mouse DCs and, additionally, LPS-induced TNF- α production was drastically inhibited in rat (20) and mouse DCs as well as in mouse macrophages (42, 57), whereas TNF- α production by human DCs was much less efficiently inhibited. Collectively, all of these observations suggest that HO-1 and CO have different inhibitory effect on rat, mouse, and human DCs.

In conclusion, the present study demonstrates that CO is capable of modulating DC functions in vitro, and that ex vivo treatment can inhibit immunogenicity in vivo in an induced autoimmune diabetes model. Although additional studies are needed to investigate the precise mechanism of CO action, our results demonstrate that CO ex vivo treatment could promote the tolerogenic capacities of DCs.

Acknowledgments

We are grateful to Roland Liblau for the gift of the Ins-HA and CL4 mouse strains. We thank Régis Josien (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 643, Nantes, France) and Michel Goldman (Institute for Medical Immunology, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium) for critical readings.

Disclosures

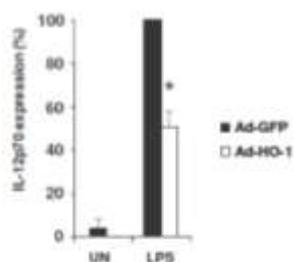
The authors have no financial conflict of interest.

References

1. Tenhunen, R., H. S. Marver, and R. Schmid. 1968. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 61: 748–755.
2. Otterbein, L. E., M. P. Soares, K. Yamashita, and F. H. Bach. 2003. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol.* 24: 449–455.
3. Yachie, A., Y. Niida, T. Wada, N. Igarashi, H. Kaneda, T. Toma, K. Ohta, Y. Kasahara, and S. Koizumi. 1999. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J. Clin. Invest.* 103: 129–135.
4. Kapturczak, M. H., C. Wasserfall, T. Brusko, M. Campbell-Thompson, T. M. Ellis, M. A. Atkinson, and A. Agarwal. 2004. Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse. *Am. J. Pathol.* 165: 1045–1053.
5. Poss, K., and S. Tonegawa. 1997. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10925–10930.
6. Willis, D., A. Moore, R. Frederick, and D. Willoughby. 1996. Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat. Med.* 2: 87–90.
7. Chauveau, C., D. Bouchet, J. Roussel, P. Mathieu, C. Braudeau, K. Renaudin, L. Tesson, J. Soullou, S. Iyer, R. Buelow, and I. Anegón. 2002. Gene transfer of heme oxygenase-1 and carbon monoxide delivery inhibit chronic rejection. *Am. J. Transplant.* 2: 581–592.
8. Braudeau, C., D. Bouchet, L. Tesson, S. Iyer, S. Remy, R. Buelow, I. Anegón, and C. Chauveau. 2004. Induction of long-term cardiac allograft survival by heme oxygenase-1 gene transfer. *Gene Ther.* 11: 701–710.

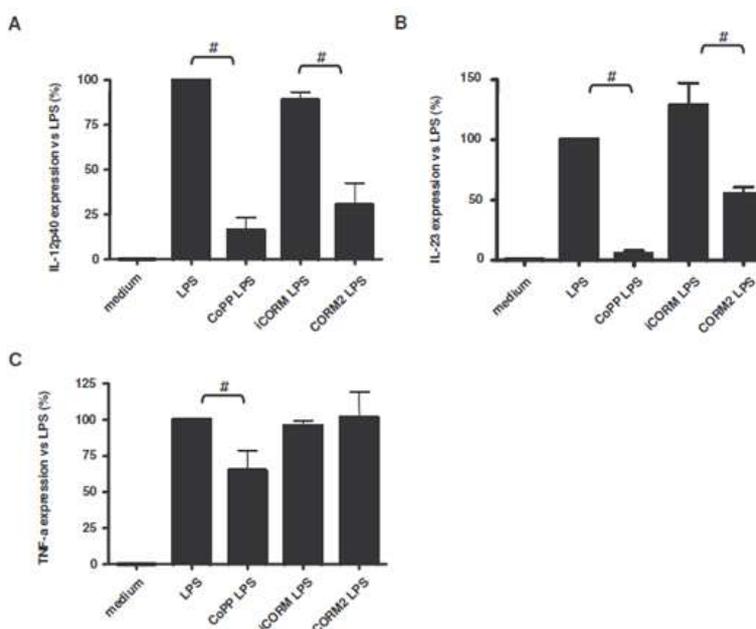
9. Abraham, N. G., A. Asija, G. Drummond, and S. Peterson. 2007. Heme oxygenase-1 gene therapy: recent advances and therapeutic applications. *Curr. Gene Ther.* 7: 89–108.
10. Hu, C. M., H. H. Lin, M. T. Chiang, P. F. Chang, and L. Y. Chau. 2007. Systemic expression of heme oxygenase-1 ameliorates type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes* 56: 1240–1247.
11. Li, M., S. Peterson, D. Husney, M. Inaba, K. Guo, E. Terada, T. Morita, K. Patil, A. Kappas, S. Ikehara, and N. G. Abraham. 2007. Interdiction of the diabetic state in NOD mice by sustained induction of heme oxygenase: possible role of carbon monoxide and bilirubin. *Antioxid. Redox Signal* 9: 855–863.
12. Chora, A. A., P. Fontoura, A. Cunha, T. F. Pais, S. Cardoso, P. P. Ho, L. Y. Lee, R. A. Sobel, L. Steinman, and M. P. Soares. 2007. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress autoimmune neuroinflammation. *J. Clin. Invest.* 117: 438–447.
13. Kim, H. P., S. W. Ryter, and A. M. Choi. 2006. CO as a cellular signaling molecule. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 46: 411–449.
14. Ollinger, R., M. Bilban, A. Erat, A. Froio, J. McDaid, S. Tyagi, E. Csizmadia, A. V. Graca-Souza, A. Liloia, M. P. Soares, et al. 2005. Bilirubin: a natural inhibitor of vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation* 112: 1030–1039.
15. Eisenstein, R. S., D. Garcia-Mayol, W. Pettingell, and H. N. Munro. 1991. Regulation of ferritin and heme oxygenase synthesis in rat fibroblasts by different forms of iron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 688–692.
16. Ferris, C. D., S. R. Jaffrey, A. Sawa, M. Takahashi, S. D. Brady, R. K. Barrow, S. A. Tysoe, H. Wolosker, D. E. Barañano, S. Doré, et al. 1999. Haeme oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron. *Nat. Cell Biol.* 1: 152–157.
17. Hill, M., V. Pereira, C. Chauveau, R. Zagani, S. Remy, L. Tesson, D. Mazal, L. Ubbillos, R. Brion, K. Ashgar, et al. 2005. Heme oxygenase-1 inhibits rat and human breast cancer cell proliferation: mutual cross inhibition with indoleamine 2,3-dioxygenase. *FASEB J.* 19: 1957–1968.
18. Morelli, A. E., and A. W. Thomson. 2007. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 610–621.
19. Steinman, R. M., D. Hawiger, and M. C. Nussenzweig. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 685–711.
20. Chauveau, C., S. Remy, P. Royer, M. Hill, S. Tanguy-Royer, F. X. Hubert, L. Tesson, R. Brion, G. Beriou, M. Gregoire, et al. 2005. Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and pro-inflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood* 106: 1694–1702.
21. Listopad, J., K. Asadullah, C. Sievers, T. Ritter, C. Meisel, R. Sabat, and W. D. Docke. 2007. Heme oxygenase-1 inhibits T cell-dependent skin inflammation and differentiation and function of antigen-presenting cells. *Exp. Dermatol.* 16: 661–670.
22. George, J. F., A. Braun, T. M. Brusko, R. Joseph, S. Bolisetty, C. H. Wasserfall, M. A. Atkinson, A. Agarwal, and M. H. Kapturczak. 2008. Suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is dependent on expression of heme oxygenase-1 in antigen-presenting cells. *Am. J. Pathol.* 173: 154–160.
23. Lo, D., J. Freedman, S. Hesse, R. D. Palmiter, R. L. Brinster, and L. A. Sherman. 1992. Peripheral tolerance to an islet cell-specific hemagglutinin transgene affects both CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Eur. J. Immunol.* 22: 1013–1022.
24. Morgan, D. J., R. Liblau, B. Scott, S. Fleck, H. O. McDevitt, N. Sarvetnick, D. Lo, and L. A. Sherman. 1996. CD8⁺ T cell-mediated spontaneous diabetes in neonatal mice. *J. Immunol.* 157: 978–983.
25. Motterlini, R., J. E. Clark, R. Foresti, P. Sarathchandra, B. E. Mann, and C. J. Green. 2002. Carbon monoxide-releasing molecules: characterization of biochemical and vascular activities. *Circ. Res.* 90: E17–E24.
26. Zuckerbraun, B. S., T. R. Billiar, S. L. Otterbein, P. K. Kim, F. Liu, A. M. Choi, F. H. Bach, and L. E. Otterbein. 2003. Carbon monoxide protects against liver failure through nitric oxide-induced heme oxygenase 1. *J. Exp. Med.* 198: 1707–1716.
27. Hegazi, R. A., K. N. Rao, A. Mayle, A. R. Sepulveda, L. E. Otterbein, and S. E. Plevy. 2005. Carbon monoxide ameliorates chronic murine colitis through a heme oxygenase 1-dependent pathway. *J. Exp. Med.* 202: 1703–1713.
28. Lee, B. S., J. Heo, Y. M. Kim, S. M. Shim, H. O. Pae, and H. T. Chung. 2006. Carbon monoxide mediates heme oxygenase 1 induction via Nrf2 activation in hepatoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343: 965–972.
29. Kim, K. M., H. O. Pae, M. Zheng, R. Park, Y. M. Kim, and H. T. Chung. 2007. Carbon monoxide induces heme oxygenase-1 via activation of protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase and inhibits endothelial cell apoptosis triggered by endoplasmic reticulum stress. *Circ. Res.* 101: 919–927.
30. Sawle, P., R. Foresti, B. E. Mann, T. R. Johnson, C. J. Green, and R. Motterlini. 2005. Carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs) attenuate the inflammatory response elicited by lipopolysaccharide in RAW264.7 murine macrophages. *Br. J. Pharmacol.* 145: 800–810.
31. Nakahara, T., Y. Moroi, H. Uchi, and M. Furue. 2006. Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement. *J. Dermatol. Sci.* 42: 1–11.
32. Ardesna, K. M., A. R. Pizze, S. Devereux, and A. Khwaja. 2000. The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF- κ B signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 96: 1039–1046.
33. Brown, K., S. Gerstberger, L. Carlson, G. Franzoso, and U. Siebenlist. 1995. Control of I κ B- α proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science* 267: 1485–1488.
34. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301: 640–643.
35. Sato, M., H. Suemori, N. Hata, M. Asagiri, K. Ogasawara, K. Nakao, T. Nakaya, M. Katsuki, S. Noguchi, N. Tanaka, and T. Taniguchi. 2000. Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN- α / β gene induction. *Immunity* 13: 539–548.
36. Yamamoto, M., S. Sato, K. Mori, K. Hoshino, O. Takeuchi, K. Takeda, and S. Akira. 2002. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN- β promoter in the Toll-like receptor signaling. *J. Immunol.* 169: 6668–6672.
37. Subara, W., M. Yoneyama, T. Iwamura, S. Yoshimura, K. Tamura, H. Namiki, S. Aimoto, and T. Fujita. 2000. Analyses of virus-induced homomeric and heteromeric protein associations between IRF-3 and coactivator CBP/p300. *J. Biochem.* 128: 301–307.
38. Stocker, R., Y. Yamamoto, A. F. McDonagh, A. N. Glazer, and B. N. Ames. 1987. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235: 1043–1046.
39. Nagakami, T., K. Toyomura, T. Kinoshita, and S. Morisawa. 1993. A beneficial role of bile pigments as an endogenous tissue protector: anticomplement effects of biliverdin and conjugated bilirubin. *Biochim. Biophys. Acta* 1158: 189–193.
40. Haga, Y., M. A. Tempero, D. Kay, and R. K. Zetterman. 1996. Intracellular accumulation of unconjugated bilirubin inhibits phytohemagglutinin-induced proliferation and interleukin-2 production of human lymphocytes. *Dig. Dis. Sci.* 41: 1468–1474.
41. Gray, C. P., P. Arosio, and P. Hersey. 2002. Heavy chain ferritin activates regulatory T cells by induction of changes in dendritic cells. *Blood* 99: 3326–3334.
42. Otterbein, L. E., F. H. Bach, J. Alam, M. Soares, H. Tao Lu, M. Wysk, R. J. Davis, R. A. Flavell, and A. M. Choi. 2000. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat. Med.* 6: 422–428.
43. Pae, H. O., G. S. Oh, B. M. Choi, S. C. Chae, Y. M. Kim, K. R. Chung, and H. T. Chung. 2004. Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation via inhibition of IL-2 production. *J. Immunol.* 172: 4744–4751.
44. Taille, C., J. El-Benna, S. Lanone, M. C. Dang, E. Ogier-Denis, M. Aubier, and J. Boczkowski. 2004. Induction of heme oxygenase-1 inhibits NAD(P)H oxidase activity by down-regulating cytochrome b558 expression via the reduction of heme availability. *J. Biol. Chem.* 279: 28681–28688.
45. Kotsch, K., P. N. Martins, R. Klemz, U. Janssen, B. Gerstmayer, A. Demier, A. Reutzel-Selke, U. Kuckelkorn, S. G. Tullius, and H. D. Volk. 2007. Heme oxygenase-1 ameliorates ischemia/reperfusion injury by targeting dendritic cell maturation and migration. *Antioxid. Redox Signal* 9: 2049–2063.
46. Ryter, S. W., J. Alam, and A. M. Choi. 2006. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol. Rev.* 86: 583–650.
47. Mashreghi, M. F., R. Klemz, I. S. Knosalla, B. Gerstmayer, U. Janssen, R. Buelow, A. Jozkowicz, J. Dulak, H. D. Volk, and K. Kotsch. 2008. Inhibition of dendritic cell maturation and function is independent of heme oxygenase 1 but requires the activation of STAT3. *J. Immunol.* 180: 7919–7930.
48. Zhang, X., P. Shan, G. Jiang, S. S. Zhang, L. E. Otterbein, X. Y. Fu, and P. J. Lee. 2006. Endothelial STAT3 is essential for the protective effects of HO-1 in oxidant-induced lung injury. *FASEB J.* 20: 2156–2158.
49. Ricchetti, G. A., L. M. Williams, and B. M. Foxwell. 2004. Heme oxygenase 1 expression induced by IL-10 requires STAT-3 and phosphoinositid-3 kinase and is inhibited by lipopolysaccharide. *J. Leukocyte Biol.* 76: 719–726.
50. Pamplona, A., A. Ferreira, J. Balla, V. Jeney, G. Balla, S. Epiphonio, A. Chora, C. D. Rodrigues, I. P. Gregoire, M. Cunha-Rodrigues, et al. 2007. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nat. Med.* 13: 703–710.
51. Steinbrink, K., M. Wolff, H. Jonuleit, J. Knop, and A. H. Enk. 1997. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J. Immunol.* 159: 4772–4780.
52. Inoue, S., M. Suzuki, Y. Nagashima, S. Suzuki, T. Hashiba, T. Tsuburai, K. Ikehara, T. Matsuse, and Y. Ishigatsubo. 2001. Transfer of heme oxygenase 1 cDNA by a replication-deficient adenovirus enhances interleukin 10 production from alveolar macrophages that attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Hum. Gene Ther.* 12: 967–979.
53. O'Neill, L. A., and A. G. Bowie. 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 353–364.
54. Sakaguchi, S., H. Negishi, M. Asagiri, C. Nakajima, T. Mizutani, A. Takaoka, K. Honda, and T. Taniguchi. 2003. Essential role of IRF-3 in lipopolysaccharide-induced interferon- β gene expression and endotoxin shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306: 860–866.
55. Goriely, S., C. Molle, M. Nguyen, V. Albarani, N. O. Haddou, R. Lin, D. De Wit, V. Flamand, F. Willems, and M. Goldman. 2006. Interferon regulatory factor 3 is involved in Toll-like receptor 4 (TLR4)- and TLR3-induced IL-12p35 gene activation. *Blood* 107: 1078–1084.
56. Ouyang, X., H. Negishi, R. Takeda, Y. Fujita, T. Taniguchi, and K. Honda. 2007. Cooperation between MyD88 and TRIF pathways in TLR synergy via IRF5 activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354: 1045–1051.
57. Nakahira, K., H. P. Kim, X. H. Geng, A. Nakao, X. Wang, N. Murase, P. F. Drain, M. Sasidhar, E. G. Nabel, T. Takahashi, et al. 2006. Carbon monoxide differentially inhibits TLR signaling pathways by regulating ROS-induced trafficking of TLRs to lipid rafts. *J. Exp. Med.* 203: 2377–2389.

Figures Supplémentaires
Rémy et al, JI, 2009



Supplemental figure 1. HO-1 gene transfer in human DCs inhibits the LPS induced secretion of IL-12p70.

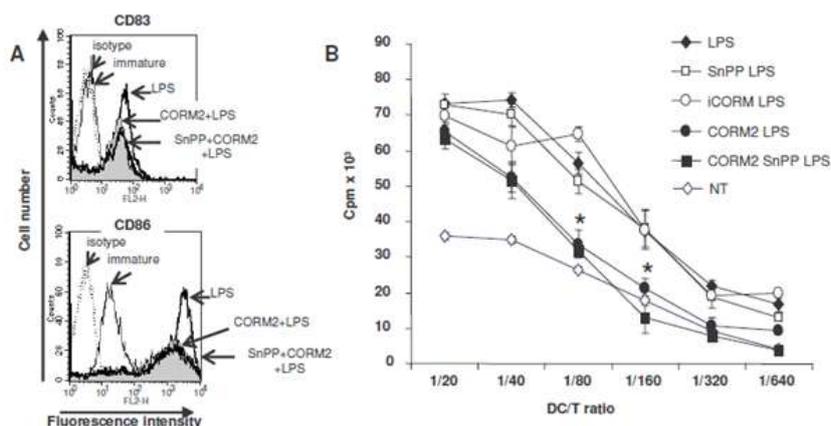
Immature human monocyte derived DCs were infected with an adenovirus coding for HO-1 and GFP or with a control adenovirus coding only for GFP. Expression of GFP and HO-1 were allowed for 24 hours before LPS stimulation. 24 hours later, production of IL-12p70 in supernatants was assessed by ELISA. Secretion was arbitrary considered to be maximal (100% from 3145 to 6062 mg/ml) for AdGFP infected cells stimulated by 500 ng/ml of LPS. Data presented here are mean \pm SD of 3 independent experiments.



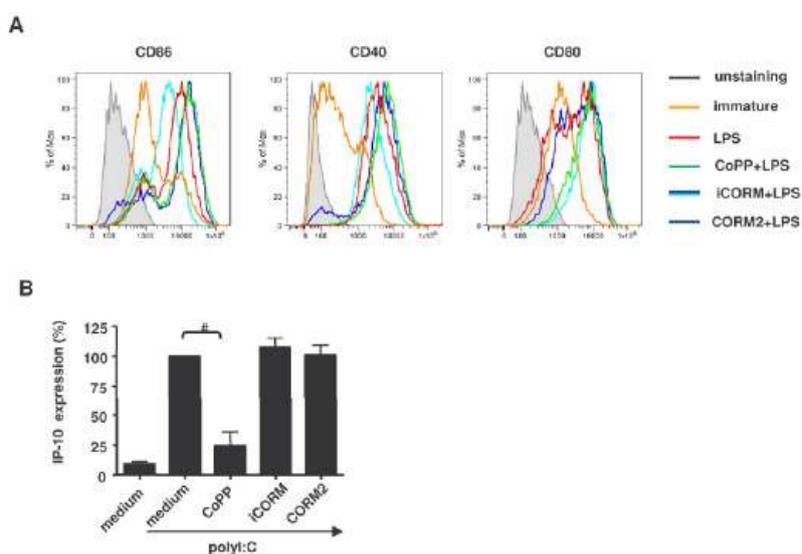
Supplemental data 2: In human DCs, HO-1 and CO inhibit IL-23 and IL-12p40 expression induced by LPS but had a weak or no effect on LPS induced TNF α secretion.

Secretion of (A) IL-12p40, (B) IL-23 and (C) TNF α by human DCs treated or not with CoPP, iCORM or CORM2 and then stimulated with LPS for 24 hours was assessed by ELISA. Maximal secretion was defined as that obtained with LPS (from 46200 to 156000 pg/ml for IL-12p40; from 923 to 5236 pg/ml for IL-23; and from 12400 to 37500 pg/ml for TNF α) and % of secretion for each treatment was expressed versus LPS. Data presented are mean \pm SD of 5 to 7 independent experiments. # $p < 0.05$.

Note that CoPP and CORM2 treatment inhibited ~80 % and ~60% of IL-12p40 secretion and ~90 % and ~50% of IL-23 secretion, respectively, whereas TNF α secretion was modestly inhibited by ~20% with CoPP and not modified by CORM2 treatment.



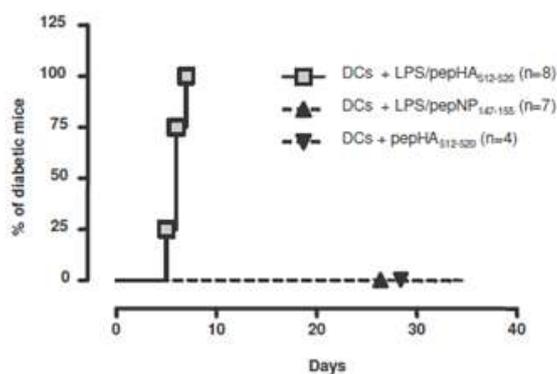
Supplemental figure 3: The inhibitory effect of CO on LPS-induced maturation is independent of HO-1 induction. A) FACS analysis showing the phenotype of human DCs treated with iCORM, CORM2 and/or SnPP (50 μ M, 2h) and stimulated with LPS. Similar results were obtained in 3 independent experiments. **B)** DCs were treated or not with iCORM, CORM2 and/or SnPP and stimulated or not with LPS. Thereafter, DCs were cultured with allogeneic T cells at different ratios for 4 days and proliferating T cells were labeled with 3H-Td. Results are shown as means \pm SD of triplicate values after subtraction of spontaneous 3H-Td. * $p < 0.005$ compared with iCORM + LPS-treated DCs by Anova test. Similar results were obtained in 3 independent experiments.



Supplemental data 4: Effect of CoPP and CO treatment on mouse DC maturation.

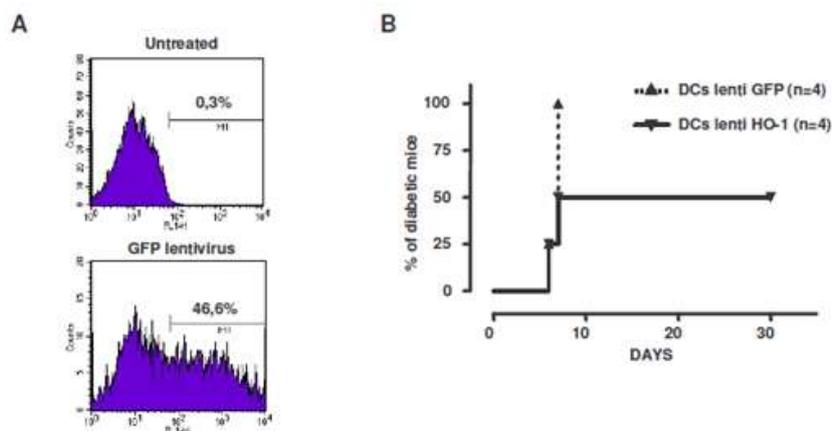
(A) Flow cytometry analysis showing the phenotype of mouse BMDCs treated or not with CoPP, iCORM or CORM2 and then stimulated with LPS for 24 hours. Expression of CD80, CD40 and CD86 was assessed. Similar results were obtained in 5 independent experiments. Note that contrary to human or rat DCs, HO-1 induction treatment did not inhibit phenotypic maturation of mouse DCs.

(B) Production of IP-10 in the supernatants of mouse BMDCs, treated or not with CoPP, iCORM or CORM2 and then stimulated with poly I:C for 24 hours, was assessed by ELISA. Secretion was arbitrary considered to be maximal (from 4000 to 9987 pg/ml) for poly I:C treatment and % of secretion for each treatment was expressed versus poly I:C. Data presented are mean \pm SD of 2 to 3 independent experiments. # $p < 0.05$.



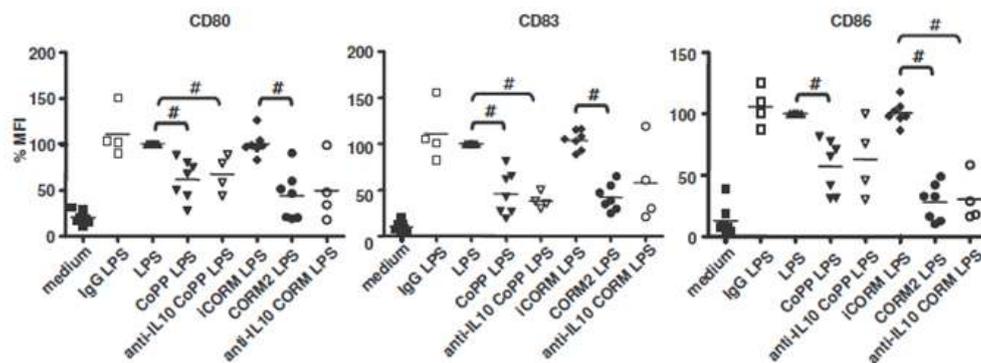
Supplemental data 5: Control groups for the diabetes model.

In the diabetes model used, transgenic mice expressing influenza virus hemagglutinin (HA) in pancreatic beta cells were adoptively transferred with anti-HA CD8⁺ T cells from transgenic mice (clone-4 TCR) and 1 day later immunized DCs. Graph shows diabetes incidences after transfer of LPS treated or not CD11c⁺ DCs and loaded with HA₅₁₂₋₅₂₀ or control influenza nucleoprotein₁₄₇₋₁₅₅ (NP₁₄₇₋₁₅₅) peptides. n=4 to 8 for each group. Note that only the group of LPS-matured CD11c⁺ DCs incubated with HA₅₁₂₋₅₂₀ peptides induced diabetes whereas immature CD11c⁺ DCs incubated with HA₅₁₂₋₅₂₀ or LPS-treated CD11c⁺ DCs incubated with NP₁₄₇₋₁₅₅ did not.



Supplemental data 6: HO-1 gene transfer into DCs inhibits antigen presentation and induction of diabetes.

(A) FACS analysis showing the percentage of GFP positive cells following transduction with a lentiviral vector coding for GFP (MOI: 20). (B) Diabetes incidence after transfer of DCs transduced by a lentiviral vector coding for HO-1 or a control lentiviral vector coding for GFP (MOI: 20) before LPS treatment and HA loading. n=4 for each group.



Supplemental data 7 : HO-1 renders DCs refractory to LPS-induced maturation independently of IL-10.

FACS analysis showing the phenotype of human DCs treated or not with CoPP, iCORM or CORM2 and/or an anti-IL-10 or a control IgG and then stimulated with LPS for 24 hours. Expression of cell markers was considered to be maximal for LPS treatment. Each point corresponds to an individual experiment and the horizontal bar corresponds to the mean. Statistical significance is indicated # $p < 0.05$.

Annexe 2 : “Immunoregulatory properties of heme oxygenase-1”

Philippe Blancou, Virginie Tardif, Thomas Simon, Séverine Rémy, Leandro Carreno, Alexis Kalergis et Ignacio Anegón.

In press, Methods in Molecular Biology, 2010

Methods in Molecular Biology

“SUPPRESSION AND REGULATION OF IMMUNE RESPONSES”

Immunoregulatory properties of heme oxygenase-1.

Philippe Blancou ¹, Virginie Tardif ², Thomas Simon ², Séverine Rémy ², Leandro Carreño ³, Alexis Kalergis ³ and Ignacio Anegón ²

¹ ONIRIS, Nantes, F-44300, France ; INRA, UMR_A 707, Nantes, F-44300, France ; University, Nantes, F-44300, France.

² INSERM, UMR 643, Nantes, F44093 France; CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITERT, Nantes, F44093 France; Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F44093 France.

³ Millennium Nucleus of Immunology and Immunotherapy, Departamento de Genética Molecular y Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica de Chile.

¹corresponding author

Rôle de l'hème-oxygénase-1 et du monoxyde de carbone dans le potentiel tolérogène des cellules dendritiques.

Le catabolisme de l'hème par l'hème oxygénase-1 (HO-1) génère du monoxyde de carbone (CO), connu pour ses effets sur l'immunité. Le traitement global au CO améliore l'issue pathogénique des maladies auto-immunes induites ou spontanées ou en allotransplantation en favorisant la tolérance. Les mécanismes cellulaires permettant de telles propriétés restent inconnus, même si de récentes études suggèrent un rôle du CO dans l'induction de cellules dendritiques (DC) tolérogènes. On a montré que le traitement CO des DCs inhibe leur maturation induite par le LPS. Ici, on montre qu'une immunisation par des DCs traitées CO chargées avec le peptide d'intérêt est suffisant pour retarder le diabète dans les souris NOD et dans un modèle de souris transgéniques, où les DCs déclenchent le diabète, suggérant un rôle pivot des DCs dans la tolérisation. Ce retard est associé à une inhibition de l'infiltration des cellules mononuclées. Cet effet des DCs traitées CO sur les T CD8+ autoréactifs est restreint au peptide, IL-10 et CD4+ indépendant. Les T CD8+ auto-réactifs sont tolérisés de façon dominante par les DCs traitées CO et leur migration dans le pancréas est fortement inhibée. Ainsi, l'immunothérapie par les DCs traitées CO donne une stratégie prometteuse dans le contrôle de l'auto-immunité par inhibition spécifique de la migration des T CD8+ pathogéniques. On a aussi évalué la capacité d'HO-1 à réguler la cross-présentation des DCs de souris. Les DCs traitées HO-1 inhibe l'activation de T CD8+ OT-I quand elles sont pulsées avec la protéine OVA mais pas quand elles sont chargées avec le peptide OVA. Mais, l'effet du CO sur la cross-présentation reste à éclaircir.

Mots Clés : DCs, HO-1, CO, Tolérance

Implication of Heme-oxygenase-1 and carbon monoxide in tolerogenic dendritic cells induction.

Catabolism of free heme by heme oxygenase-1 (HO-1) generates carbon monoxide (CO) that was shown to mediate immune related effects. *In toto* CO treatment improves pathogenic outcome in induced or spontaneous autoimmune diseases or in allotransplantation by promoting tolerance. The cellular mechanism underlying such properties remains unknown, although recent experimental data point toward a role of CO in the induction of tolerizing dendritic cell (DC). Indeed, we showed CO treatment in DCs inhibits the LPS-induced maturation of DCs. Herein, we show that an immunization of CO-treated DC loaded with relevant peptide is sufficient to delay diabetes incidence in NOD mice and in a transgenic mouse model where DC triggers diabetes, suggesting that DC have a pivotal role in CO-induced tolerance. This delay is associated with the inhibition of mononuclear cell infiltration in the pancreas and the lack of pathogenic autoreactive T-cells in the periphery. The effect of CO-treated DC on autoreactive CD8+ T cells is shown to be peptide restricted, IL-10 and CD4+ T cells independent. Autoreactive CD8+ T cells are dominantly tolerized by CO-treated DC and their migration to the pancreas is strongly inhibited. Thus, immunotherapy using CO-treated DC emerges as a promising strategy in controlling autoimmune disease by specifically inhibiting pathogenic CD8 T cells migration. We also have addressed the capacity of HO-1 to regulate antigen cross-presentation in mouse DCs. HO-1 inhibits DCs ability to induce CD8+ OT-I T cell activation when DCs were pulsed with OVA protein, but not when DCs were pulsed with exogenous OVA peptide. But, CO effect on cross-presentation remains unclear.

Key Words: DCs, HO-1, CO, Tolerance