

UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ DE MÉDECINE

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTÉ

Année 2010

N° 18

Spécialisation fonctionnelle des sous-populations de  
cellules dendritiques plasmacytoïdes chez le rat

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Science de la vie

Spécialité : Immunologie

*Présentée et soutenue publiquement par*

**Thomas ANJUBAULT**

*Le 15 Octobre 2010, devant le jury ci-dessous*

Rapporteurs : Gilles DADAGLIO, CR Pasteur, PARIS  
Brigitte LE MAUFF, PU/PH, CAEN

Examineurs : Nathalie BENDRISS-VERMARE, CR1 INSERM, Lyon  
Dominique HEYMANN, PU/PH, Nantes

Directeur de thèse : Régis JOSIEN, PU/PH, Nantes

# Table des matières

Liste des Tableaux.....	8
Liste des Figures.....	9
Abréviations.....	15
Introduction Bibliographique.....	16
I. Généralités sur les cellules dendritiques.....	17
Nature de la cellule dendritique.....	17
Rôle des cellules dendritiques.....	18
<b>Reconnaissance des pathogènes.....</b>	<b>18</b>
<b>Capture Antigénique.....</b>	<b>23</b>
<b>Apprêtement et présentation des antigènes.....</b>	<b>26</b>
a. CMH I et peptides endogènes.....	26
b. CMH II et peptides exogènes.....	27
c. Présentation croisée de peptides exogènes sur le CMH I.....	28
d. Présentation sur les molécules CD1.....	29
<b>Vers une cellule présentatrice d'antigènes professionnelle.....</b>	<b>29</b>
a. Activation et maturation des DC.....	29
b. Migration vers les organes lymphoïdes secondaires.....	31
<b>Activation des Lymphocytes T.....</b>	<b>32</b>
a. La synapse immunologique.....	32
b. Vers des lymphocytes dits TH.....	36
c. Vers des lymphocytes dits régulateurs.....	37
d. Vers la tolérance.....	38
Les populations de cellules dendritiques.....	38
<b>Les DC résidentes des organes lymphoïdes.....</b>	<b>38</b>
<b>Les DC des tissus non-lymphoïdes.....</b>	<b>39</b>
<b>Les DC plasmacytoïdes.....</b>	<b>40</b>
<b>Les DC inflammatoires.....</b>	<b>41</b>

Ontogénèse des cellules dendritiques .....	41
Le système immunitaire du rat .....	43
II. LES CELLULES DENDRITIQUES PLASMACYTOÏDES .....	45
Découverte des cellules dendritiques plasmacytoïdes .....	45
Phénotype des pDC .....	46
Développement des pDC .....	48
Localisation des pDC dans l'organisme et migration .....	49
Les pDC dans l'immunité innée .....	51
<b>Des acides nucléiques à la production d'IFN de type 1 .....</b>	<b>51</b>
<b>Rôle de l'IFN de type 1 dans l'immunité innée .....</b>	<b>53</b>
a. IFN et virus .....	53
b. IFN et cellules NK .....	53
c. IFN et DC .....	53
d. Régulation de la réponse IFN de type 1 .....	54
<b>Le rôle cytotoxique des pDC .....</b>	<b>54</b>
Les pDC dans l'immunité adaptative .....	55
.....	55
<b>IFN et immunité adaptative .....</b>	<b>55</b>
<b>Capture et présentation antigénique .....</b>	<b>56</b>
<b>Différenciation et maturation des pDC .....</b>	<b>57</b>
<b>Vers des Lymphocytes Th .....</b>	<b>58</b>
<b>Vers des Lymphocytes T régulateurs et tolérance .....</b>	<b>59</b>
Rôle des pDC en pathologie .....	60
<b>Infections virales .....</b>	<b>60</b>
<b>Autoimmunité .....</b>	<b>63</b>
<b>Cancer .....</b>	<b>64</b>
Les sous-populations de pDC .....	66
III. La triade TRANCE-RANK-OPG .....	70
TRANCE .....	70

<b>Structure</b> .....	<b>70</b>
<b>Expression</b> .....	<b>72</b>
Les récepteurs de TRANCE.....	72
Effets biologiques .....	73
<b>Ostéoclastogénèse</b> .....	<b>73</b>
<b>Rôle de TRANCE dans le système immunitaire</b> .....	<b>74</b>
Implication de la triade en pathologie .....	75
Résultats.....	79
Objectifs de l'étude .....	80
I. Caractérisation des sous-populations de pDC chez le rat .....	82
Article 1 : 85C7, un nouvel anticorps monoclonal permettant la discrimination de deux populations de pDC chez le rat .....	82
Résultats complémentaires.....	106
<b>Génération d'un Ac monoclonal anti-pDC de rat</b> .....	<b>107</b>
<b>Phénotype des cellules 85C7+</b> .....	<b>107</b>
<b>Test de la cytotoxicité des populations de pDC</b> .....	<b>111</b>
IV. Analyse du transcriptome des sous-populations de pDC chez le rat par puces à ADNc .....	113
Réalisation des puces à ADN .....	113
Gènes d'intérêt potentiel .....	116
V. Etude de l'expression et de la fonction de TRANCE par les populations de pDC chez le rat .....	130
Article 2: Constitutive expression of TRANCE by rat plasmacytoid dendritic cells .....	130
Résultats complémentaires.....	153
<b>Expression et production de TRANCE par les LB</b> .....	<b>153</b>
<b>Analyse de l'expression de TRANCE chez la souris</b> .....	<b>154</b>
<b>Ostéoclastogénèse médiée par les pDC</b> .....	<b>158</b>
Discussion .....	161
Conclusion .....	176
Bibliographie .....	177



## Liste des Tableaux

Tableau 1 - Les principaux CLR exprimés par les DC et leurs ligands.....	19
Tableau 2 - Expression des TLR par les différentes populations de DC. -, ±, + et ++ indique l'expression relative de l'ARNm de chaque TLR. ND signifie Non Déterminé. ....	20
Tableau 3 - Les récepteurs impliqués dans le chimiotactisme exprimés par les DC humaines. -, ±, + et ++ indiquent l'expression relative de chaque récepteur. ND signifie Non Déterminé. ....	31
Tableau 4 - Les différents profils TH .....	36
Tableau 5 - Phénotypes des DC conventionnelles résidentes des organes lymphoïdes. -, ±, +, ++ et +++ indiquent l'expression relative de la protéine de chaque marqueur. ND signifie Non Déterminé.....	39
Tableau 6 - Les populations de DC de la peau chez l'homme et la souris. -, ±, + et ++ indiquent l'expression relative de la protéine de chaque marqueur. ND signifie Non Déterminé. ....	40
Tableau 7 - Phénotype des pDC. -, ±, +, ++ et +++ indiquent l'expression relative de la protéine de chaque marqueur. ND signifie Non Déterminé. ....	47
Tableau 8 - Propriétés tolérogéniques des pDC.....	60
Tableau 9 - Séquence des amorces de gènes d'intérêt potentiel des puces à ADNc .....	118

## Liste des Figures

- Figure 1 - Localisation des TLR. D'après Alexis-Biochemicals.com. Les TLR1, 2, 4, 5, 6, 10 et 11 sont présents à la surface de la cellule alors que les TLR3, 7, 8 et 9 sont intracellulaires et exprimés dans des endosomes. Le TLR4 est exprimé en association avec le CD14 et MD2. Le TLR2 peut être exprimé seul à la surface de la cellule ou bien en association soit avec le TLR1 soit avec le TLR6. .... 21
- Figure 2 - La Phagocytose (D'après Desjardins, 2003). La phagocytose est initiée par la liaison de particules à un récepteur de surface (a). Le cytosquelette va alors se réarranger, notamment les filaments d'actine(b). Des pseudopodes vont se former autour de la particule reconnue(c). La particule sera ainsi internalisée dans une vésicule appelée phagosome. La source de membrane nécessaire à la formation de ce phagosome provient soit de la membrane elle-même, soit d'endosome de recyclage ou encore du réticulum endoplasmique..... 24
- Figure 3 - Mécanisme d'endocytose dépendant de la clathrine (D'après [http://seiri1.med.okayama-u.ac.jp/research\\_activities/research\\_contents/index003wuhtml.html](http://seiri1.med.okayama-u.ac.jp/research_activities/research_contents/index003wuhtml.html)). Les ligands se lient à leurs récepteurs, concentrés en petits domaines, reliés entre eux dans leur partie cytoplasmique par des protéines endocytiques. La clathrine intervient, forçant l'invagination de la membrane et l'internalisation des molécules reconnues. La clathrine va alors se séparer de la vésicule qui est ensuite dirigée vers les lysosomes. .... 25
- Figure 4 - Mécanisme d'autophagie. D'après Xie Z.; Nat. Cell Bio. 2007. Le matériel cytosolique est séquestré dans une poche de membrane appelée phagophore. Ceci entraîne la formation d'une vésicule à double membrane, l'autophagosome. La membrane externe de cet autophagosome fusionne avec des lysosomes. La membrane interne de l'autophagosome va alors être lysées et son contenu dégradé. .... 26
- Figure 5 - Les voies de présentation antigénique dans les DC (D'après Villadangos, Nat. Rev. Immunol., 2007). Les molécules de CMH de classe I présentent des peptides dérivés de protéines endogènes dégradées par le protéasome dans le cytosol. Les molécules de CMH de classe II acquièrent des peptides générés par dégradation protéolytique de protéines exogènes dans les endosomes. Les molécules du CMH ce classe II peuvent aussi présenter des peptides issus de la dégradation de composants endogènes comme des protéines de la membrane plasmique, de la voie endocytique ou encore des protéines du cytosol accédant aux endosomes par autophagie. Certaines DC ont la capacité de présenter sur les molécules de CMH I des peptides exogènes. Ce phénomène est appelé présentation croisée. .... 28
- Figure 6- La synapse immunologique. A gauche, vue latérale de la synapse avec les différentes interactions entrant en jeu. A droite, vue de face de la synapse immunologique avec en marron le cSMAC, en vert l'anneau périphérique pSMAC et en gris l'anneau distal dSMAC. D'après Huppa, Nat Rev Immunol, 2003. .... 33
- Figure 7 - Les molécules de co-stimulation. Schématisation des molécules de co-stimulation de la famille B7-CD28 (en rose) et de la famille des récepteurs au TNF (en bleu) ainsi que

des signaux stimulateurs (en vert) ou inhibiteurs (en rouge) qu'elles induisent. D'après Pardoll, Nat Rev Immunol, 2002..... 35

Figure 8 - Différenciation des DC et des macrophages chez la souris. D'après Geissmann, Science, 2010. Dans la moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques (HSCs) produisent les progéniteurs communs aux lignées lymphoïde (LP) et myéloïde (MP). Ce MP génèrera les monocytes, des macrophages et le précurseur commun aux DC (CDP). Deux populations de monocytes, Ly-6C positive ou négative, quittent la MO pour entrer dans le sang. Le CDP se différenciera en précurseur de DC conventionnel (cDC) et en pDC. Les précurseurs de cDC circulent dans le sang pour rejoindre les tissus lymphoïdes où ils donneront les cDC CD8+ et CD8-. Ils migrent aussi vers les tissus non-lymphoïdes pour donner les DC CD103+ de la lamina propria (lpDC). Dans des conditions normales, les monocytes Ly-6C- vont contribuer au développement des macrophages alvéolaires et les monocytes Ly-6C+ vont devenir des lpDC CX3CR1+ dans les tissus non-lymphoïdes. En cas d'inflammation, les monocytes Ly-6C+ donnent des DC dérivées des monocytes, comme les TipDC, des macrophages inflammatoires et pourraient également contribuer aux cellules myéloïde suppressives associées aux tumeurs. Les monocytes Ly-6C+ sont aussi suspectés d'induire des LC et la Microglie dans des conditions expérimentales particulières. La contribution du LP à la génération des pDC et des cDC reste encore peu claire. .... 42

Figure 9 - Morphologie des pDC. (A) Coloration au Giemsa X400 de pDC humaines immatures; (B) Observation en microscopie électronique à balayage X3000 de pDC humaines immatures; (C) Observation en microscopie électronique à transmission X7000 de pDC humaines immatures. D'après Liu, Annu Rev Immunol, 2005. .... 46

Figure 10 - Voies de signalisation induites par les acides nucléiques dans les pDC. D'après Gilliet, Nat Rev Immunol, 2008. Les pDC immatures expriment préférentiellement les TLR7 et 9. Ces TLR sont délocalisés vers des endosomes en présence d'acides nucléiques ou de virus. La reconnaissance de leur ligand induit l'activation de MyD88 et entraîne une cascade d'évènements aboutissant à la transcription des gènes d'IFN. Cette cascade entraîne ensuite la transcription des gènes de cytokines pro-inflammatoires et de molécules de co-stimulation..... 52

Figure 11 - Morphologie des pDC avant et après maturation. Observation de pDC en microscopie électronique à transmission X3000 au repos (A) et après maturation en présence d'IL-3 et de CD40L (B). D'après Colonna, Nat Immunol, 2004. .... 58

Figure 12 - Rôle des pDC chez les patients infectés par le VIH. D'après Fitzgerald-Bocarsly, J Leuko Bio, 2010. Les pDC entrent dans la circulation depuis la moelle osseuse. Elles migrent vers les tissus lymphoïdes ou circulent jusqu'à rencontrer un virus HIV-1 vivant ou défectueux, ou bien d'autres pathogènes. La rencontre avec le HIV-1 peut entraîner l'activation des pDC et la production d'IFN $\alpha$ , une maturation complète ou partielle des pDC, l'apoptose des pDC ou encore la fusion des pDC avec les LT CD4+ infectés par le HIV-1. Ceci peut entraîner la migration des pDC vers les ganglions lymphatiques et leur remplacement par des pDC immatures provenant de la MO. Les auteurs supposent que la formation de pDC dans la MO pourrait décliner au cours de l'infection dû à un épuisement de la réplication. De forts taux d'IFN $\alpha$  induisent l'expression de TRAIL par les pDC, les transformant en IKpDC. Cela induit aussi l'expression des molécules HLA-DR par les LT CD4+. Ceci est supposé entraîner la mort et la déplétion des LT infectés et des LT ayant rencontré un virus défectueux, mais également la mort des pDC. .... 63

Figure 13 - Les pDC en pathologie humaine. D'après Lande, Ann NY Acad Sci, 2010. Lors d'une infection virale aiguë, les pDC sont activées et produisent de grandes quantités d'IFN

de type I après reconnaissance des acides nucléiques viraux par les TLR7 et 9 endosomaux. L'IFN de type I produit confère une résistance antivirale et initie l'immunité antivirale en activant les cDC, LT, cellules NK et LB. Dans les cas d'infections virales chroniques, les pDC sont soit déplétées soit deviennent fonctionnellement inertes face à une stimulation virale. L'absence de production d'IFN de type I entraîne la persistance du virus et la chronicité de l'infection. Lors de maladies auto-immunes, les pDC détectent en continue des complexes d'acides nucléiques dérivés de l'hôte. Ceci conduit à une production excessive d'IFN de type I et donc à une activation continue des cDC qui entraîne l'autoimmunité. Lors de cancer, les pDC s'accumulent dans la tumeur en absence de signaux activateurs. Ces pDC non-activées induisent et maintiennent des LTreg, créant un micro-environnement immunosuppressif autour de la tumeur, favorisant ainsi son développement. .... 66

Figure 14 - Représentation de la triade TRANCE/RANK/OPG. La protéine TRANCE est présente sous trois isoformes: une forme complète, une forme ne présentant plus la partie intracellulaire et une forme soluble qui ne contient ni la partie intracellulaire ni la partie transmembranaire. La forme membranaire peut être relarguée sous forme soluble par clivage protéolytique par une métalloprotéase, TACE. Son récepteur est RANK. Il existe également une forme soluble du récepteur, l'OPG, qui joue un rôle inhibiteur de l'interaction entre TRANCE et RANK. .... 71

Figure 15 – Ostéoclastogénèse. Schématisation de la différenciation des précurseurs de la MO (CFU-M) jusqu'à la formation d'ostéoclastes matures. Ceci passe par la formation de cellules multinucléées. M-CSF et TRANCE sont indispensables pour ce mécanisme. TRANCE est produit par les ostéoblastes et les cellules stromales. L'OPG peut neutraliser TRANCE et bloquer l'ostéoclastogénèse. D'après <http://cancergrace.org/cancer-101/2009/04/16/intro-to-denosumab/>..... 74

Figure 16 - Rôle des LT Th17 dans l'arthrite rhumatoïde. D'après Takayanagi, Nat Rev, 2007. Dans les cas d'arthrite rhumatoïde, l'inflammation de synovie envahit et détruit l'os. Les cellules de la synovie sont des macrophages et des fibroblastes, des DC, des cellules endothéliales et des LT infiltrants. Les LTh17 sont les LT pro-ostéoclastiques. Ils ne produisent pas d'IFN $\gamma$  qui supprime la voie de signalisation TRANCE, mais sécrètent beaucoup d'IL-17 qui induit l'expression de TRANCE par les fibroblastes de la synovie. L'IL-17 stimule également l'inflammation locale et active les macrophages à produire des cytokines pro-inflammatoires. Ces cytokines activent l'ostéoclastogénèse soit directement en agissant sur les précurseurs des ostéoclastes, soit en induisant l'expression de TRANCE sur les fibroblastes de la synovie. Les LT Th17 expriment également TRANCE à leur surface, ce qui contribue également à augmenter l'ostéoclastogénèse. .... 77

Figure 17A - Phénotype des cellules 85C7+ de la moelle osseuse. Analyse par cytométrie en flux du phénotype des cellules de la moelle osseuse en fonction de leur expression du 85C7. 109

Figure 18 - Etude de la cytotoxicité des populations de pDC. A. Expression de l'ARNm de Granzyme C sur les populations de pDC. B. Cytotoxicité des DC sur les cellules Yac. .... 112

Figure 19 – Protocole des puces à ADNc. A. Protocole de marquage des ARNc à la digoxygénine. B. Protocole d'hybridation et de révélation des puces à ADNc. D'après Applied Biosystems NanoAmp RT-IVT Labeling Kit protocol..... 114

Figure 20 - Analyse des puces à ADNc. A. Analyse des résultats de puces par le logiciel R représenté en clustering. B. Nombre de gènes différenciellement exprimés entre les différentes populations de DC chez le rat par le logiciel Genespring. .... 116

Figure 21 - Validation des résultats de puces à ADN obtenus pour le gène CD3 $\gamma$ . (A) Différence d'expression du gène codant CD3 $\gamma$  entre les pDC CD4<sup>high</sup> et CD4<sup>low</sup> fraîchement triées ou après maturation 24h en présence de CpG B. (B) Expression de l'ARNm CD3 $\gamma$  dans les populations de DC fraîchement triées ou après maturation 6h ou 24h en présence de CpG B chez le rat. (C) Expression de l'ARNm CD3 $\gamma$  dans les populations de DC fraîchement triées ou après maturation 6h ou 24h en présence de CpG B chez la souris ainsi que dans les cellules ganglionnaires fraîchement préparée ou après activation 6h ou 24h en présence de Concanavalline A. \*\*\*, p < 0.001 ..... 119

Figure 22 - Validation des résultats de puces à ADNc obtenus pour le gène CD8 $\beta$ . (A) Différence d'expression du gène codant CD8 $\beta$  entre les pDC CD4<sup>high</sup> et CD4<sup>low</sup> fraîchement triées ou après maturation 24h en présence de CpG B. (B) Expression de l'ARNm CD8 $\beta$  dans les populations de DC fraîchement triées ou après maturation 6h ou 24h en présence de CpG B chez le rat. (C) Expression de l'ARNm CD8 $\beta$  dans les populations de DC fraîchement triées ou après maturation 6h ou 24h en présence de CpG B chez la souris ainsi que dans les cellules ganglionnaires fraîchement préparée ou après activation 6h ou 24h en présence de Concanavalline A. \*\*\*, p < 0.001 ..... 120

Figure 23 - Validation des résultats de puces à ADNc obtenus pour le gène CD209a. Différence d'expression du gène codant CD209a entre les pDC CD4<sup>high</sup> et CD4<sup>low</sup> fraîchement triées ou après maturation 24h en présence de CpG B. (B) Expression de l'ARNm CD209a dans les populations de pDC fraîchement triées ou après maturation 24h en présence de CpG B chez le rat. .... 121

Figure 24 - Validation des résultats obtenus par puces à ADNc pour le gène EPCR. (A) Différence d'expression du gène codant EPCR entre les pDC CD4<sup>high</sup> et CD4<sup>low</sup> fraîchement triées ou après maturation 24h en présence de CpG B. (B) Expression de l'ARNm EPCR dans les populations de DC fraîchement triées ou après maturation 6h ou 24h en présence de CpG B chez le rat. (C) Expression de l'ARNm EPCR dans les populations de DC fraîchement triées ou après maturation 6h ou 24h en présence de CpG B chez la souris, dans les cellules ganglionnaires fraîchement préparée ou après activation 6h ou 24h en présence de Concanavalline A, ainsi que dans une préparation de cellules placentaire fraîche. \*, p < 0,05; \*\*\*, p < 0.001 ..... 122

Figure 25 - Validation des résultats de puces à ADNc obtenus pour le gène Granzyme C. Différence d'expression du gène codant Granzyme C entre les pDC CD4<sup>high</sup> et CD4<sup>low</sup> fraîchement triées ou après maturation 24h en présence de CpG B. (B) Expression de l'ARNm Granzyme C dans les populations de pDC fraîchement triées ou après maturation 24h en présence de CpG B chez le rat. .... 123

Figure 26- Validation des résultats obtenus par puces à ADNc pour le gène Pygm. (A) Différence d'expression du gène codant Pygm entre les pDC CD4<sup>high</sup> et CD4<sup>low</sup> fraîchement triées ou après maturation 24h en présence de CpG B. (B) Expression de l'ARNm Pygm dans les populations de DC fraîchement triées chez le rat. (C) Expression de l'ARNm Pygm dans les populations de DC fraîchement triées ou après maturation 6h en présence de CpG B chez la souris, dans les cellules ganglionnaires fraîchement préparée ou après activation 6h ou 24h en présence de Concanavalline A, ainsi que dans une préparation de cellules musculaire fraîche. .... 124

Figure 27 - Validation des résultats de puces à ADNc obtenus pour le gène de la Reeline. (A) Différence d'expression du gène codant la Reeline entre les pDC CD4<sup>high</sup> et CD4<sup>low</sup> fraîchement triées ou après maturation 24h en présence de CpG B. (B) Expression de l'ARNm Reeline dans les populations de DC fraîchement triées ou après maturation 6h ou

24h en présence de CpG B chez le rat, dans des cellules ganglionnaires fraîchement préparées ou après maturation 6h ou 24h en présence de Concanavoline A, dans des LT ou B fraîchement triés ou après 24h de maturation en présence de Conca,avaline A pour les LT, et 24h et 48h en présence de CpG B pour les LB. (C) Expression de l'ARNm Reeline dans les populations de DC fraîchement triées ou après maturation 6h ou 24h en présence de CpG B chez la souris, dans les cellules ganglionnaires fraîchement préparée ou après activation 6h ou 24h en présence de Concanavoline A, ainsi que dans une préparation de cellules du cervelet fraîche. \*, p < 0,05; \*\*\*, p < 0.001 ..... 125

Figure 28 - Validation des résultats de puces à ADNc obtenus pour le gène RoBo-1. (A) Différence d'expression du gène codant la RoBo-1 entre les pDC CD4high et CD4low fraîchement triées ou après maturation 24h en présence de CpG B. (B) Expression de l'ARNm RoBo-1 dans les populations de DC fraîchement triées ou après maturation 6h ou 24h en présence de CpG B chez le rat, dans des cellules ganglionnaires fraîchement préparées ou après maturation 6h ou 24h en présence de Concanavoline A, dans des LT ou B fraîchement triés ou après 24h de maturation en présence de Concanavoline A pour les LT, et 24h et 48h en présence de CpG B pour les LB. (C) Expression de l'ARNm Slc11a1 dans les populations de DC fraîchement triées ou après maturation 6h ou 24h en présence de CpG B chez le rat, dans les cellules ganglionnaires fraîchement préparée ou après activation 6h ou 24h en présence de Concanavoline A, dans des LT ou B fraîchement triés ou après 24h de maturation en présence de Concanavoline A pour les LT, et 24h et 48h en présence de CpG B pour les LB ainsi que dans une préparation de cellules pulmonaires fraîche. \*\*\*, p < 0.001 ..... 127

Figure 29 - Validation des résultats obtenus par puces à ADNC pour le gène VLDLR. (A) Différence d'expression du gène codant VLDLR entre les pDC CD4high et CD4low fraîchement triées ou après maturation 24h en présence de CpG B. (B) Expression de l'ARNm VLDLR dans les populations de DC fraîchement triées ou après maturation 6h ou 24h en présence de CpG B chez le rat. (C) Expression de l'ARNm VLDLR dans les populations de DC fraîchement triées ou après maturation 6h en présence de CpG B chez la souris. \*\*, p < 0.01; \*\*\*, p < 0.001 ..... 128

Figure 30 - Expression et production de TRANCE par les LB. (A) Analyse par cytométrie en flux de l'expression de TRANCE sur des LB fraîchement triés ou après maturation 24h ou 48h en présence de LPS, CpG 2006 (CpG B) et CpG 2216 (CpG A). (B) Production de TRANCE soluble analysée par ELISA dans les surnageants de culture de cellules ganglionnaires après 6h, 12h et 24h d'activation en présence de Concanavoline A, ainsi que dans des surnageants de stimulation de LB triés et maturés 24h ou 48h en présence de LPS, CpG A ou CpG B. Le temps 0 correspond au milieu de culture seul utilisé. .... 154

Figure 31 - Analyse de l'expression de TRANCE chez la souris. (A) Méthode de purification par cytométrie en flux des populations de pDC CD4+/- chez la souris à paritr de cellules spléniques murines. (B) Expression de l'ARNm TRANCE dans les populations de pDC CD4+ et CD4- fraîchement triées ou après maturation 6h en présence de CpG B, ainsi que dans des cellules ganglionnaires fraîchement préparées ou après 6h et 24h d'activation en présence de Concanavoline A chez la souris. (C) Expression de la protéine TRANCE par cytométrie en flux dans des cellules ganglionnaires fraîchement préparées ou après 24h d'activation en présence de Concanavoline A chez la souris. (D) Expression de la protéine TRANCE par cytométrie en flux dans des pDC fraîchement triées ou après 24h de maturation en présence de CpG B chez la souris. (E) Expression de la protéine TRANCE par cytométrie en flux dans des pDC fraîchement triées issues de ganglions mésentériques ou non, de la moelle osseuse, de la rate, du sang ou bien du thymus chez la souris. (F) Production de

TRANCE soluble analysée par ELISA dans les surnageants de 24h de culture de pDC en présence de CpG 1826 (CpG B), ou bien de 24h et 48h de stimulation de cellules ganglionnaires en présence de Concanavaline A. Le temps 0 correspond au milieu de culture seul utilisé. .... 157

Figure 32 - Modèle d'ostéoclastogénèse à partir de cellules de la moelle osseuse. (A) Protocole de différenciation de précurseurs de la moelle osseuse en ostéoclastes. (B) Résultats de la différenciation de précurseurs de la moelle osseuse en utilisant le protocole décrit en (A) en absence de TRANCE soluble ou bien en présence de 100 ou 200 ng/mL de TRANCE soluble lors des 3 derniers jours de différenciation et après coloration TRAP. (C) Résultats de la différenciation de précurseurs de la moelle osseuse en utilisant le protocole décrit en (A) en présence de 100 000 pDC CD4<sup>high</sup>, CD4<sup>low</sup> et de cellules ganglionnaires préalablement stimulées 24h en présence de CpG B pour les pDC et de Concanavaline A pour les cellules ganglionnaires puis fixées 15 min en présence de PFA 2%, avec ou sans ajout de 100 ng/mL de TRANCE soluble lors des 3 derniers jours de différenciation et après coloration TRAP. .... 159

Figure 33 - Modèle d'ostéoclastogénèse à partir de la lignée cellulaire 4B12. Résultats de 14 jours de culture de 2000 cellules de la lignée 4B12 dans des puits de plaques 96 puits à fond plat en présence de TRANCE soluble (50 ng/mL), de 10 000 pDC CD4<sup>high</sup> ou CD4<sup>low</sup> stimulées 24h en présence de CpG B puis fixées 15 min avec du PFA 2%, ou encore en présence de cellules ganglionnaires stimulées 24h en présence de Concanavaline A puis fixées 15 min avec du PFA 2%. Les puits sont ensuite colorés par coloration TRAP. .... 160

## Abréviations

<b>AA</b> : Acides Aminés	<b>LN</b> : <i>Lymph Node</i>
<b>Ac</b> : Anticorps	<b>LPS</b> : LipoPolySaccharide
<b>ADN</b> : Acide DésoxyriboNucléique	<b>LRR</b> : <i>Leucine Riche Repeat</i>
<b>ADNdb</b> : AND double brin	<b>LT</b> : Lymphocyte T
<b>Ag</b> : Antigène	<b>MO</b> : Moelle Osseuse
<b>Aire</b> : <i>Autoimmune regulator</i>	<b>mPDCA</b> : <i>mouse pDC Antigen</i>
<b>ARN</b> : Acide RiboNucléique	<b>MR</b> : Mannose Receptor
<b>ARNsb</b> : ARN simple brin	<b>mTEC</b> : Cellule endothéliale thymique médullaire
<b>bp</b> : paire de base	<b>MyD88</b> : <i>Myeloid Differentiation gene 88</i>
<b>CCL</b> : <i>C-C Chemokine Ligand</i>	<b>MyD88</b> : <i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
<b>CCR</b> : <a href="#">C-C chemokine receptor</a>	<b>NKT</b> : <i>Natural Killer T cell</i>
<b>CD</b> : Cluster de Différenciation	<b>nTreg</b> : Lymphocyte T régulateur naturel
<b>cDC</b> : <i>Conventional Dendritic Cell</i>	<b>ODF</b> : facteur de différenciation des ostéoclastes
<b>CDP</b> : Précurseur commun aux DC	<b>OL</b> : Organe Lymphoïde
<b>CLP</b> : Progéniteur Lymphoïde Commun	<b>OPG</b> : Ostéoprotégérine
<b>CLR</b> : <i>C-type Lectin Receptor</i>	<b>PAMP</b> : <i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>
<b>CMH</b> : Complexe Majeur d'Histocompatibilité	<b>pDC</b> : <i>Plasmacytoid Dendritic Cell</i>
<b>CMKLR</b> : <i>Chemokine Receptor-Like</i>	<b>PKC</b> : Protéine Kinase C
<b>CMP</b> : Progéniteur Myéloïde Commun	<b>PRR</b> : <i>Pattern Recognition Receptor</i>
<b>CMV</b> : Cytomégalovirus	<b>RANK</b> : <i>Receptor activator for NF-κB</i>
<b>CPA</b> : Cellule Présentatrice d'Antigène	<b>RANKL</b> : <i>Receptor activator for NF-κB Ligand</i>
<b>CpG</b> : Cytosine Phospho Guanine	<b>RE</b> : Réticulum Endoplasmique
<b>CR</b> : Récepteur au Complément	<b>RSV</b> : <i>Respiratory Syncytial Virus</i>
<b>CRD</b> : <i>Carbohydrate Recognition Domain</i>	<b>SI</b> : Système Immunitaire
<b>CTLA</b> : <i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen</i>	<b>siRNA</b> : <i>Small Interference RNA</i>
<b>DC</b> : <i>Dendritic Cell</i>	<b>SLE</b> : Lupus érythémateux systémique
<b>DC-LAMP</b> : <i>DC-Lysosome Associated Membrane glycoProtein</i>	<b>SMAC</b> : <i>SupraMolecular Activation Cluster</i>
<b>DC-SIGN</b> : <i>Dendritic Cell Specific ICAM-3 Grabbing Non-integrin</i>	<b>SR</b> : Récepteur Scavenger
<b>DEC-205</b> : <i>Dendritic and Epithelial Cell-205</i>	<b>TAP</b> : <i>Transporter associated with antigen processing</i>
<b>EAE</b> : encéphalomyélite autoimmune expérimentale	<b>TCR</b> : <i>T Cell Receptor</i>
<b>EC</b> : <i>Endothelial Cell</i>	<b>Teff</b> : Lymphocyte T effecteur
<b>FcR</b> : Récepteur au fragment Fc des Immunoglobulines	<b>TGF</b> : Tumor Growth Factor
<b>GlcNAc</b> : N-AcétylGlucosamine	<b>TIR</b> : <i>Toll/IL-1 Receptor</i>
<b>HIV</b> : Virus de l'immunodéficience humaine	<b>TLR</b> : <i>Toll-like Receptor</i>
<b>HSC</b> : Cellule Souche Hématopoïétique	<b>TNF</b> : <i>Tumor Necrosis Factor</i>
<b>HSP</b> : <i>Heat Shock Protein</i>	<b>TNFR</b> : Récepteur au TNF
<b>HSV</b> : <i>Herpes Simplex Virus</i>	<b>TRANCE</b> : <i>TNF-related activation-induced cytokine</i>
<b>ICAM</b> : <i>IntraCellular Adhesion Molecule</i>	<b>Treg</b> : Lymphocyte T régulateur
<b>IDO</b> : Indoleamine 2,3-dioxygénase	<b>TRIF</b> : <i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
<b>Ig</b> : ImmunoGlobuline	<b>TSLP</b> : <i>LymphoPoïétine Stromale Thymique</i>
<b>IL</b> : Interleukine	<b>VEGF</b> : <i>Vascular endothelial growth factor</i>
<b>iNOS</b> : Inductible Nitric Oxyde Synthase	<b>VIH</b> : Virus de l'Immunodéficience Humaine
<b>IPC</b> : Cellule Productrice d'Interféron	<b>VLA-4</b> : <i>Very Late Antigen-4</i>
<b>IS</b> : Synapse Immunologique	<b>VSV</b> : Virus de la Stomatite Vésiculaire
<b>iTreg</b> : Lymphocyte T régulateur induit	
<b>LB</b> : Lymphocyte B	
<b>LC</b> : <i>Langerhans Cell</i>	
<b>LFA</b> : <i>Lymphocyte function-associated antigen</i>	
<b>Lin</b> : Lineage	

---

# Introduction Bibliographique

---

# I. Généralités sur les cellules dendritiques

C'est en 1868 que furent décrites pour la première fois les "cellules dendritiques" par **Paul Langerhans** (Langerhans, 1868). On pensa pendant longtemps que ces cellules situées dans l'épiderme étaient d'origine neurale, et ceci en raison de leur morphologie dendritique; elles furent nommées **cellules de Langerhans**. Il fallut attendre un peu plus d'un siècle pour que ces cellules soient identifiées comme **Cellules Dendritiques** ("*Dendritic Cells*" en anglais ou "DC"). Elles furent décrites et ainsi nommées pour la première fois par Ralph Steinman et Zanvil Cohn en 1973 (Steinman et Cohn, 1973) en raison de leurs longs prolongements cytoplasmiques devenus caractéristiques. C'est en 1978, que Ralph Steinman et al. associèrent une fonction à cette morphologie particulière (Steinman et Witmer, 1978) et mirent en évidence la forte capacité de **présentation antigénique** des DC aux lymphocytes T, celle-ci étant très largement supérieure à celle des lymphocytes B et des macrophages. Dès lors, les DC ont été le sujet de très nombreuses recherches de par leur position charnière entre **l'immunité inné et adaptative**. Leur place incontournable au cœur du système immunitaire est désormais clairement établie et acquise au sein de la communauté scientifique.

## Nature de la cellule dendritique

Les DC sont ainsi nommées en raison de leur morphologie caractéristique. Elles présentent en effet de longs **prolongements cytoplasmiques**. Ce sont des cellules d'origine **hématopoïétique**, rares dans l'organisme, représentant moins de 1% des cellules dans le sang et les organes lymphoïdes, mais présentes dans la plupart des tissus de l'organisme. On les retrouve en effet dans les **organes lymphoïdes**, site stratégique pour l'initiation de la réponse immunitaire adaptative, ainsi qu'aux sites de contact avec l'environnement, tels les **muqueuses** ou la **peau**, où elles agissent comme **sentinelles** et peuvent facilement et rapidement rencontrer les pathogènes (Banchereau et Steinman, 1998; Banchereau et al., 2000). Leur rareté rend leur étude in-vivo complexe et explique leur étude largement répandue in-vitro.

Les DC font également preuve d'une extraordinaire **plasticité**, tant morphologique que phénotypique et fonctionnelle. En effet, d'un point de vue phénotypique il n'existe pas de marqueur commun à toutes les DC ni de marqueur exclusivement restreint aux DC. Leur **phénotype** varie selon leur localisation dans l'organisme et leur état d'activation (immature ou mature). De plus les marqueurs qui permettent leur identification sont différents entre l'homme, la souris et le rat ce qui ajoute un niveau de complexité à leur étude.

D'un point de vue phénotypique, les DC subissent de lourds remaniements de leur cytosquelette au cours de leur maturation, les amenant à produire les longs prolongements cytoplasmiques qui les caractérisent.

Leur principale fonction est de capturer et de présenter des Ag aux lymphocytes T naïfs; La capture se fait par **phagocytose** de particules microbiennes (Inaba et al., 1993; Moll et al., 1993; Reis e Sousa et al., 1993; Svensson et al., 1997); **macro-pinocytose** de fluide extracellulaire et de solutés (Sallusto et al., 1995) ou encore par **endocytose** médiée par des récepteurs spécifiques de macromolécules (Jiang et al., 1995)(Sallusto et Lanzavecchia, 1994). Ces caractéristiques font des DC des **cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles**.

La définition d'une DC se révèle donc être principalement due à sa fonction.

## Rôle des cellules dendritiques

Présentes dans la plupart des tissus, les DC sont dans un état dit "**immature**" où elles sont incapables de stimuler des lymphocytes T (LT). Elles sont en revanche très bien équipées pour **reconnaître** et **capturer des antigènes** (Ag), événement clé de l'induction d'une réponse immune, qui induira leur **maturation** complète (Banchereau et Steinman, 1998).

### Reconnaissance des pathogènes

La reconnaissance d'un Ag par une DC peut se faire par différentes voies :

- **Les récepteurs de la famille des lectines de type C** (CLR) : Les CLR sont des protéines transmembranaires reconnaissant des motifs sucrés, tels le mannose ou le galactose, grâce à un domaine de reconnaissance des carbohydrates (en anglais *Carbohydrate Recognition Domain* (CRD)). Ces récepteurs sont pour la plupart des **protéines transmembranaires de type II** ne comportant qu'un seul CRD (Figdor et al., 2002) comme **DC-SIGN** (CD209) (Geijtenbeek et al., 2000a), la **langerine** (CD207) (Valladeau et al., 2000a) et

**BDCA-2** (CD303) (Dzionic et al., 2001a). Il existe néanmoins des CLR de type I qui sont composés de plusieurs CRD, comme les **récepteurs au mannose** (CD206) (en anglais Mannose Receptor (MR)) (Stahl, 1990) qui contiennent 8 domaines CRD (Taylor et al., 1990) et **DEC-205** (CD205) qui en contient 10 (Kato et al., 1998) (Tableau 1). Le domaine intracytoplasmique des CLR est court mais néanmoins important puisqu'il contient les motifs nécessaires à l'endocytose des particules liées au récepteur. Mais pour la plupart, ce domaine intracellulaire n'induit pas l'activation de la cellule étant donné qu'il ne contient pas de motif de signalisation (East et Isacke, 2002). La Dectine-2 ne comporte certes pas de motifs de signalisation intracellulaire, mais elle peut s'associer au récepteur au fragment Fc des IgG et induire une signalisation intracellulaire via ce récepteur (Sato et al., 2006b). La Dectine-1, quant à elle, comporte un motif ITAM dans sa partie intracellulaire qui lui permet d'induire une signalisation intracellulaire (Herre et al., 2004).

**Tableau 1 - Les principaux CLR exprimés par les DC et leurs ligands**

Récepteur	Type	Ligands	Expression
<b>MR (CD206)</b>	I	Mannose, Glucose, GlcNAc	cDC, LC, Monocyte, Macrophage, Endothélium
<b>Endo-180</b>	I	Mannose, Glucose, GlcNAc	Fibroblaste, Macrophage, Endothélium
<b>DEC-205 (CD205)</b>	I	Inconnu	cDC, LC, pDC, Macrophage
<b>DC-SIGN (CD209)</b>	II	VIH, Mannose, ICAM-2, ICAM-3	cDC
<b>Langerine</b>	II	Mannose, Glucose, GlcNAc	LC
<b>BDCA-2 (CD303)</b>	II	Inconnu	pDC
<b>Dectine-1</b>	II	Glucose liés $\beta$ 1-3 et $\beta$ 1-6	DC, LC, Macrophage
<b>Dectine-2</b>	II	Mannose (hypothétique)	DC, LC, Macrophage, Neutrophile

cDC : DC conventionnel; LC : Cellule de Langerhans; pDC : DC plasmacytoïde

- **Les Toll-like récepteurs (TLR)** : Les Toll récepteurs ont tout d'abord été décrits chez la drosophile comme indispensables à leur immunité innée chez cet organisme dépourvu d'immunité adaptative (Lemaitre et al., 1996). 9 récepteurs Toll différents ont pu être identifiés chez la drosophile lui assurant une défense efficace contre les pathogènes par la production de **peptides antimicrobiens** comme la **Drosomycine**. Leur équivalent chez les mammifères a été identifié un an plus tard chez l'homme et nommé **TLR** (Medzhitov et al., 1997). À ce jour la famille des TLR chez l'homme compte 11 membres (TLR1-11), 13 chez la souris (TLR1-13) et 10 chez le rat (TLR1-7, 9, 10, 13) (Leulier et Lemaitre, 2008). Ces protéines transmembranaires de type 1 ont un domaine cytoplasmique très homologue à celui des **récepteurs à l'interleukine-**

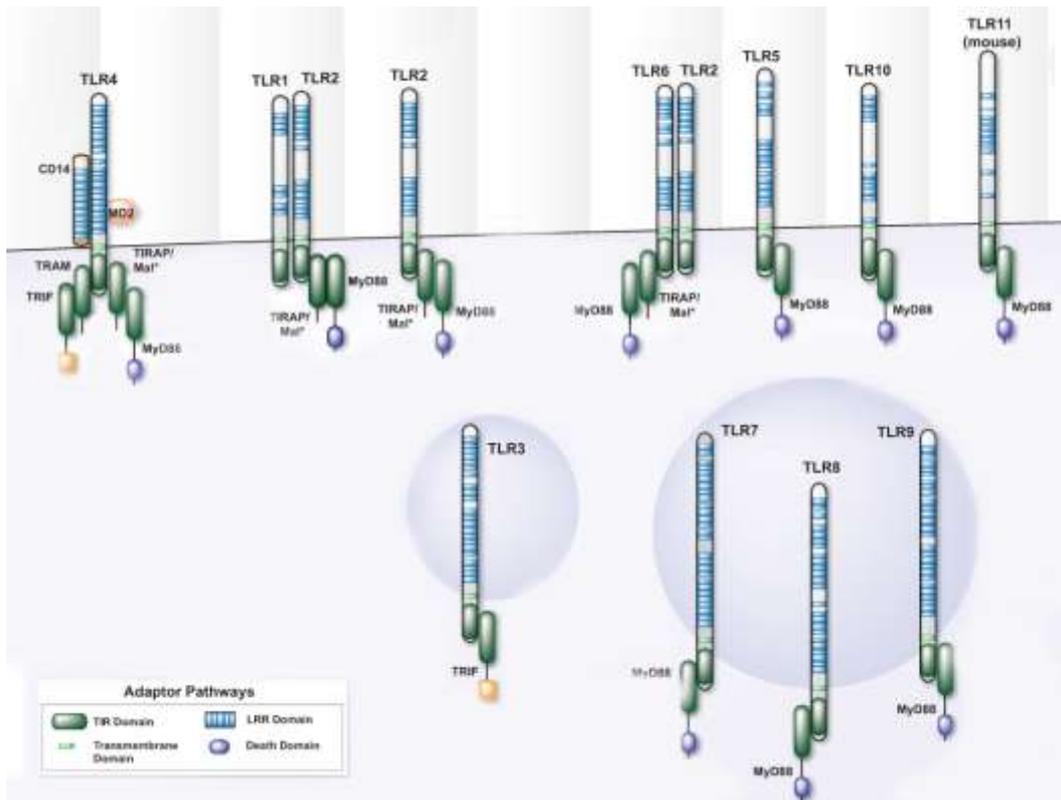
**1 (IL-1)**, ce qui leur vaut d'être appelés domaine **Toll/IL-1 récepteur** (TIR). Quant à leur partie extracellulaire, elle présente une séquence riche en leucine (LRR).

Les TLR reconnaissent des molécules différentes provenant de divers types de microorganismes. De plus, les sous-populations de DC, que je décrirai dans un prochain paragraphe, expriment un répertoire de TLR différent leur conférant une spécificité de réponse vis-à-vis d'un type de pathogène particulier. Les DC plasmacytoïdes (pDC) par exemple expriment les TLR 7 et 9 ce qui leur confère une spécificité de réponse aux **virus** tandis que les DC conventionnelles (cDC) expriment les TLR1, 2, 3, 4, 5, 6 et 8; ce qui les rend capable de réagir en présence de **bactéries** (Tableau 2). Les TLR 1, 2, 4, 5, 6, et 10 sont présents à la surface cellulaire tandis que les TLR3, 7, 8 et 9 sont localisés dans des compartiments intracellulaires (Figure 1) (Takeda et Akira, 2005).

**Tableau 2 - Expression des TLR par les différentes populations de DC.** -, ±, + et ++ indique l'expression relative de l'ARNm de chaque TLR. ND signifie Non Déterminé.

	Human		Mouse			Rat		
	cDC	pDC	DC CD8+	DC CD8-	pDC	DC CD4+	DC CD4-	pDC
<b>TLR1</b>	+	±	+	+	+	++	++	±
<b>TLR2</b>	+	-	+	+	+	++	++	+
<b>TLR3</b>	++	-	++	±	-	++	++	±
<b>TLR4</b>	+	-	±	±	±	+	+	+
<b>TLR5</b>	+	-	±	++	+	+	+	±
<b>TLR6</b>	+	+	+	++	+	+	+	±
<b>TLR7</b>	-	++	-	+	++	+	±	++
<b>TLR8</b>	++	-	+	+	+	+	±	+
<b>TLR9</b>	-	++	+	+	++	+	+	++
<b>TLR10</b>	+	±	ND	ND	ND	+	++	±
<b>TLR11</b>	-	-	+	+	ND	ND	ND	ND

D'après Liu, Ann Rev Immunol, 2005; Reis e Sousa, Immunol, 2004; Hubert, J Immunol, 2006



**Figure 1 - Localisation des TLR.** D'après Alexis-Biochemicals.com. Les TLR1, 2, 4, 5, 6, 10 et 11 sont présents à la surface de la cellule alors que les TLR3, 7, 8 et 9 sont intracellulaires et exprimés dans des endosomes. Le TLR4 est exprimé en association avec le CD14 et MD2. Le TLR2 peut être exprimé seul à la surface de la cellule ou bien en association soit avec le TLR1 soit avec le TLR6.

**Les TLR1, 2, 4 et 6** reconnaissent des **lipides** de la paroi bactérienne, fongique ou de parasites. Le TLR2 reconnaît une grande diversité de lipoprotéines comme les **peptidoglycanes** des bactéries Gram-positives, les **lipoprotéines**, les **lipoarabinomannes** de la paroi cellulaire des mycobactéries, le **glycosyl-phosphatidylinositol** du Trypanosome et des composés de la paroi fongique. Il peut aussi reconnaître un **LPS atypique** dont la structure diffère du LPS reconnu par le TLR4 (Hirschfeld et al., 2001). Le TLR 2 forme des hétérodimères avec les TLR1 ou -6 ayant une spécificité bien particulière (Ozinsky et al., 2000). Le TLR2 peut aussi coopérer avec la **dectine-1** (Gantner et al., 2003) et aussi former un hétérodimère avec le **TLR10**, TLR dont le ligand n'a toujours pas été clairement identifié (Hasan et al., 2005). Le TLR4 se complexe au **CD14** et à la protéine **MD2** pour reconnaître le **lipopolysaccharide** (LPS) des bactéries. Il peut aussi reconnaître les **acides lipotéichoïques**, les **protéines de choc thermiques** (HSP60 et HSP70) et le **fibrinogène**. Il est aussi impliqué dans la réponse au **virus respiratoire syncytial** (en anglais *Respiratory Syncytial Virus* (RSV)) (Kurt-Jones et al., 2000).

**Les TLR5 et 11** reconnaissent des ligands protéiques. Le TLR 5 est fortement exprimé par les DC intestinales et reconnaît la **flagelline**, une protéine du flagelle bactérien (Hayashi et al., 2001). Le TLR11, seulement décrit chez la souris et présent sous la forme d'un **pseudogène** chez l'homme, reconnaît les **bactéries uropathogènes** (Zhang et al., 2004) et une molécule ressemblant à la **profiline** produite par le *Toxoplasma Gondii* (Yarovinsky et al., 2005).

**Les TLR3, 7, 8 et 9** sont localisés dans des endosomes où ils détectent des acides nucléiques provenant de virus ou de bactéries. Le TLR3 reconnaît l'**ARN double brin** produit par de nombreux virus pendant leur réplication (Alexopoulou et al., 2001). Les TLR7 et 8 reconnaissent des composés synthétiques de la famille des **imidazoquinolines** comme l'**imiquimod** et le **resiquimod** (R848) (Jurk et al., 2002) et les **ARN simples brins** riches en Guanine et Uracile (Diebold et al., 2004) comme ceux du virus VIH, de l'influenza ou du virus de la stomatite vésiculaire (VSV). Le TLR7 reconnaît également des analogues de la guanosine comme la **Loxoribine** (Heil et al., 2003) et des **siRNA** (small interference-RNA), qui sont des séquences d'ARN double brin de 21 nucléotides qui entraînent la dégradation de la séquence qu'ils vont reconnaître (Hornung et al., 2005). Le TLR9 reconnaît des motifs **CpG non-méthylés** présent dans l'ADN bactérien et viral (Hemmi et al., 2000). Des oligodéoxynucléotides synthétiques portant des motifs CpG (CpG ODN) miment l'effet de ces motifs naturels et sont d'efficaces agonistes du TLR9. Trois classes distinctes de CpG sont connues, basées sur leurs différences structurelles. Les CpG de classe A (Chez l'homme : CpG ODN 2216 et 2336; chez la souris : CpG ODN 1585) stimulent les pDC à produire de grandes quantité d'IFN de type 1 et induisent la maturation des APC. Les CpG de classe B (Chez l'homme : CpG ODN 2006; chez la souris : CpG ODN 1668 et 1826) activent les pDC, les LB et les cellules NK mais n'induisent qu'une faible production d'IFN de type 1. Les CpG de classe C (Chez l'homme et la souris : CpG 2395), quant à eux, présentent les caractéristiques des deux premières classes. Cette spécificité de reconnaissance des motifs CpG non-méthylés permet de prévenir, de façon incomplète, la reconnaissance des ADN de mammifères qui, contrairement aux ADN bactériens ou viraux, ont un fort taux de méthylation. Le TLR9 peut également reconnaître des acides non-nucléiques comme l'**hémozoïne**, ou pigment malarique, qui permet de détecter la présence de parasites responsables de la malaria (Coban et al., 2005).

**Les TLR12 et 13** sont très peu décrits et leurs ligands restent inconnus pour le moment.

- **Les récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines (Ig)** : Comme les macrophages, les DC, ou certaines d'entre elles, expriment les récepteurs au **fragment Fc des**

**IgG** (FcγR) de type I (CD64), de type II (CD32) et de type III (CD16) (Fanger et al., 1996; Esposito-Farese et al., 1995). Une sous-population de DC de la peau exprime également des FcR au IgA (FcaR) (CD89) (Geissmann et al., 2001). Une expression de FcεRII (CD23) a également été montrée par des LC et des cDC (Bieber, 1992; Krauss et al., 1993). Ces récepteurs assurent la capture de **complexes immuns** ou d'**Ag opsonisés**.

- **Les récepteurs aux molécules du complément** (CR) : Les pathogènes peuvent être opsonisés par les molécules du complément permettant aux cellules exprimant leurs récepteurs de les phagocyter. Les cDC expriment le **CR3** (CD11b/CD18) et le **CR4** (CD11c/CD18) qui sont des intégrines reconnaissant des fractions de C3 (Bajtay et al., 2006).

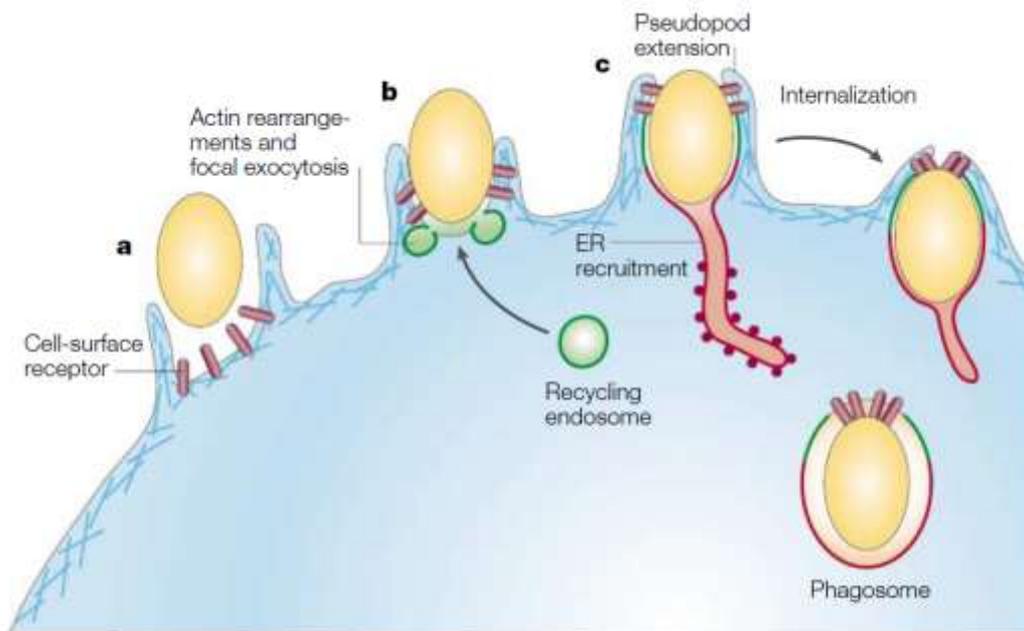
- **Les récepteurs scavenger** (SR) : Ces récepteurs sont impliqués dans l'élimination des **cellules apoptotiques** et **nécrotyques**. Les cDC expriment certains de ces récepteurs comme **SR-A**, **SR-B1**, **LOX1** et **CD36** (Platt et al., 1998; Nickel et al., 2009).

- **Les intégrines** : D'autres intégrines sont impliquées dans la phagocytose de cellules apoptotiques : **αvβ3** et **αvβ5** (Rubartelli et al., 1997; Albert et al., 1998a).

## Capture Antigénique

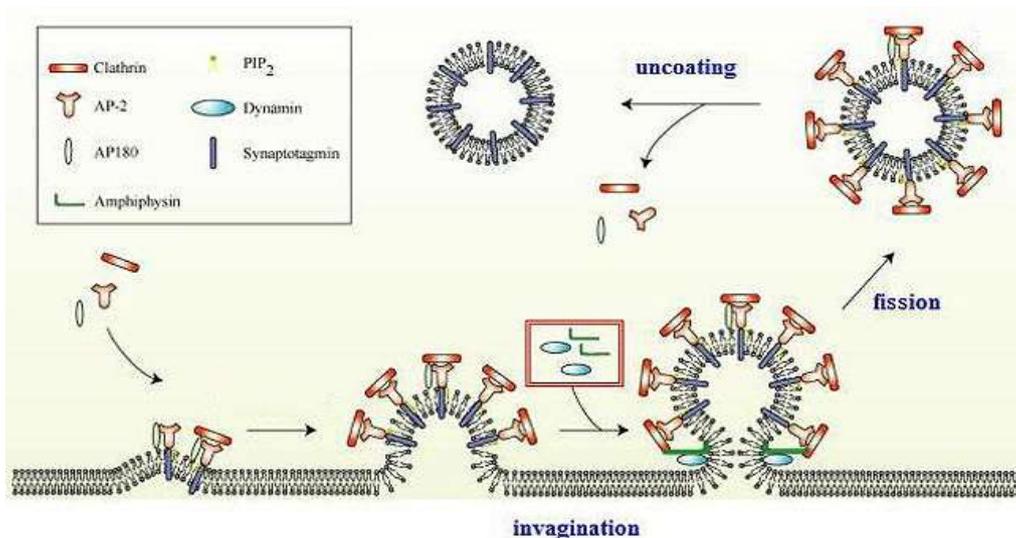
Les DC sont spécialisées dans la présentation antigénique. Les Ag sont internalisés et apprêtés pour être présentés sur les molécules du CMH II aux lymphocytes T (LT). La DC utilise plusieurs mécanismes pour capturer les Ag en fonction de leur taille et de l'intervention d'un récepteur ou non :

- **La phagocytose** : La phagocytose est un processus actif et déclenché par lequel une cellule capture un pathogène entier comme un virus, une bactérie, un parasite intracellulaire mais aussi des cellules apoptotiques et nécrotyques, puis l'internalise. Les DC ne sont pas les seules à utiliser ce mécanisme. En effet, il est aussi utilisé par les neutrophiles, les monocytes et les macrophages (Aderem et Underhill, 1999; Rubartelli et al., 1997; Albert et al., 1998b). La phagocytose se déroule en 4 étapes (Figure 2). La cellule **reconnait** tout d'abord le pathogène via les récepteurs qu'elle exprime comme des lectines, les FcR, le MR, les CR, les SR et les intégrines. Vient ensuite l'**ingestion** de la particule par le réarrangement des filaments d'actine, puis l'**internalisation**, par la fusion des membranes entourant la particule phagocytée. Elle se retrouve alors dans un phagosome qui fusionne avec des lysosomes contenant des **enzymes protéolytiques** qui vont dégrader la particule (Garin et al., 2001).



**Figure 2 - La Phagocytose** (D'après Desjardins, 2003). La phagocytose est initiée par la liaison de particules à un récepteur de surface (a). Le cytosquelette va alors se réarranger, notamment les filaments d'actine(b). Des pseudopodes vont se former autour de la particule reconnue(c). La particule sera ainsi internalisée dans une vésicule appelée phagosome. La source de membrane nécessaire à la formation de ce phagosome provient soit de la membrane elle-même, soit d'endosome de recyclage ou encore du réticulum endoplasmique.

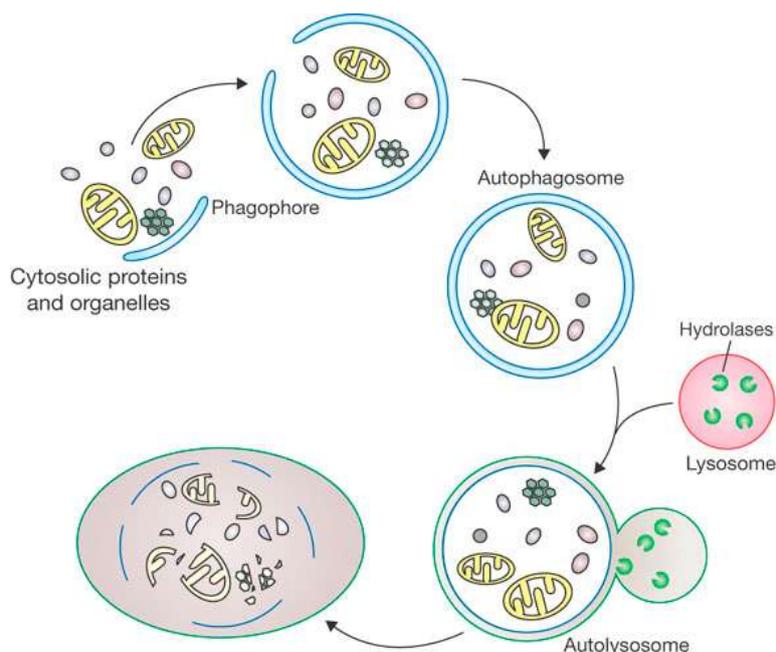
- **L'endocytose** : L'endocytose est la capture de **macromolécules** déclenchée par fixation sur des récepteurs comme les FcγR et les CLR. La fixation entraîne la formation d'un réseau de **clathrine** qui forme une dépression dans la membrane et conduit à l'internalisation de la molécule (Figure 3). Il a été montré récemment que des virions du HIV-1 pouvaient aussi être endocytés par cette voie par des DC (Cambi et al., 2009).



**Figure 3 - Mécanisme d'endocytose dépendant de la clathrine** (D'après [http://seiri1.med.okayama-u.ac.jp/research\\_activities/research\\_contents/index003wuhtml.html](http://seiri1.med.okayama-u.ac.jp/research_activities/research_contents/index003wuhtml.html)). Les ligands se lient à leurs récepteurs, concentrés en petits domaines, reliés entre eux dans leur partie cytoplasmique par des protéines endocytiques. La clathrine intervient, forçant l'invagination de la membrane et l'internalisation des molécules reconnues. La clathrine va alors se séparer de la vésicule qui est ensuite dirigée vers les lysosomes.

- **La macropinocytose** : La macropinocytose est la formation de **larges vésicules dépendantes de l'actine**, qui permettent l'internalisation de grandes quantités de **solutés**. Pour la majorité des cellules utilisant ce processus, un stimulus est nécessaire pour induire l'initiation de la macropinocytose. C'est en revanche une fonction constitutive chez les DC qui corrèle avec leur fonction de **sentinelles** de l'organisme (Norbury, 2006). Il a également été montré récemment que des virus comme le virus de la vaccine pouvaient utiliser ce mécanisme pour entrer dans les DC (Sandgren et al., 2010).

- **La macro-autophagie** : Ce phénomène consiste en la formation de membranes emprisonnant dans une vésicule, appelé **autophagosome**, une partie du cytosol de la DC. Cette vésicule va ensuite fusionner avec des lysosomes et des endosomes tardifs entraînant la **dégradation** du contenu autophagosomal et de sa membrane interne (Figure 4) (Schmid et Münz, 2007). Ce mécanisme est utilisé pour combattre des pathogènes ou des virus intracellulaires (Gutierrez et al., 2004; Nakagawa et al., 2004; Schmid et Münz, 2005). Cela joue également un rôle important dans la présentation antigénique sur le CMH II (Menéndez-Benito et Neefjes, 2007). Ce phénomène est aussi utilisé dans des conditions de **stress** par la cellule, notamment en cas de privation de glucose ou d'acides aminés (aa).



**Figure 4 - Mécanisme d'autophagie.** D'après Xie Z.; Nat. Cell Bio. 2007. Le matériel cytosolique est séquestré dans une poche de membrane appelée phagophore. Ceci entraîne la formation d'une vésicule à double membrane, l'autophagosome. La membrane externe de cet autophagosome fusionne avec des lysosomes. La membrane interne de l'autophagosome va alors être lysées et son contenu dégradé.

## Apprêtement et présentation des antigènes

Comme évoqué précédemment, la principale fonction des DC est la présentation des Ag sur des molécules de CMH de classe I ou II qui seront ainsi reconnus par un **récepteur T** (TCR) **spécifique** à la surface d'un LT naïf. Ce contact est indispensable à l'activation des LT. Pour remplir leur fonction physiologique, les protéines du CMH doivent tout d'abord acquérir un peptide antigénique, une étape qui se déroule de manière différente pour les 2 classes de molécules du CMH.

### a. CMH I et peptides endogènes

Les molécules du CMH I, exprimées par toutes les cellules somatiques, peuvent présenter à leur surface des peptides dits **endogènes**. Ce sont des peptides issus de la dégradation de composants intracellulaires. Ils sont ensuite présentés aux **LT CD8+** qui deviendront des LT **cytotoxiques**. Ce phénomène se divise en 6 étapes (Vyas et al., 2008) (Figure 5):

- **Acquisition de l'antigène** : Les protéines d'une cellule ne restent pas éternellement fonctionnelles et peuvent au cours de leur vieillissement devenir **dangereuses**

pour la cellule elle-même, tout comme des protéines nouvellement synthétisées mais comportant des erreurs. Ce sont ces protéines qui seront ciblées.

- **Marquage de la protéine par l'ubiquitine.** L'ubiquitine est une protéine de 76 aa qui sert de marqueur de protéine à détruire. Plusieurs ubiquitines se fixent sur la protéine qui sera ainsi reconnue par le protéasome.

- **Protéolyse :** Le protéasome, un complexe cytosolique composé de multiples **protéases**, dégrade ces protéines poly-ubiquitinylées en peptides de 4 à 24 aa.

- **Adressage de ces peptides au Réticulum Endoplasmique (RE) :** Les peptides sont délivrés dans le RE par l'intermédiaire des protéines **TAP** (Transporter Associated with Antigen Processing).

- **Fixation du peptide sur les molécules du CMH I :** Les peptides sont chargés sur une molécule du CMH I nouvellement synthétisée avec l'aide du complexe de chargement du peptide. Ce complexe est composé de protéines dont la **Tapasine** et de deux protéines constitutives du RE, la **calréticuline** et **ERp57**.

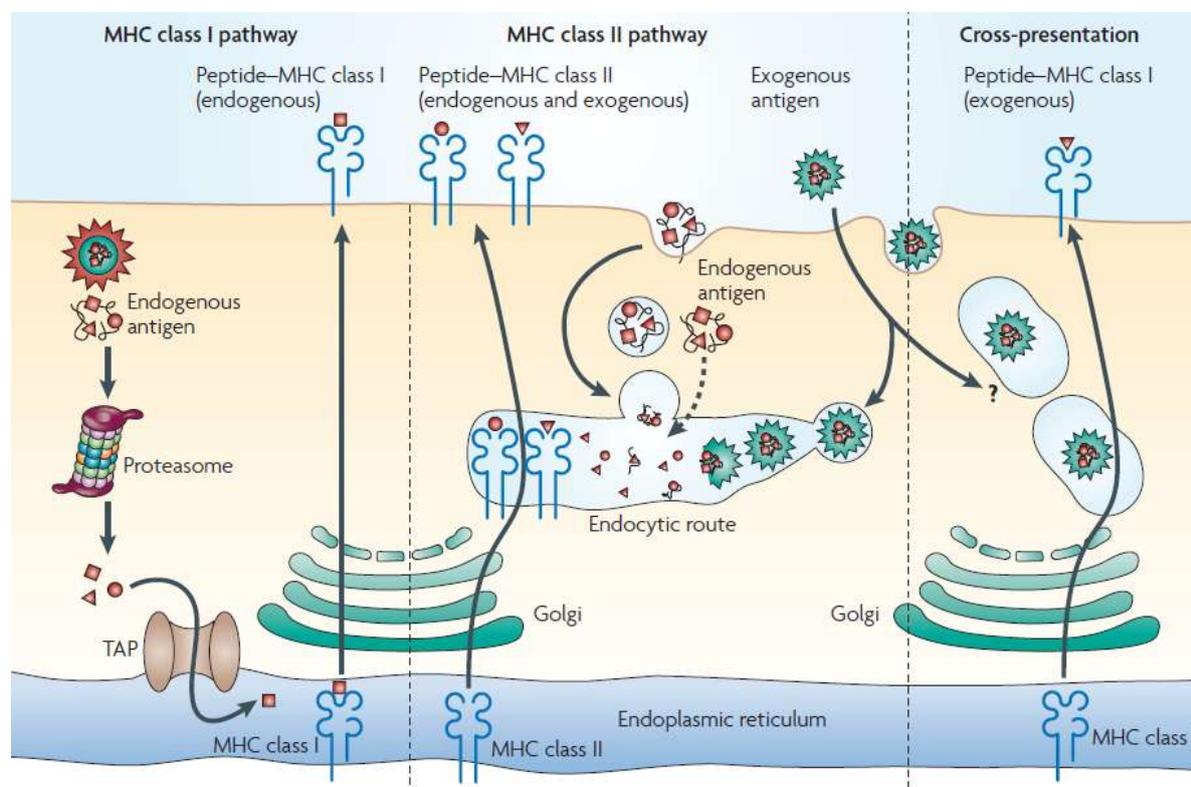
- **Exposition du complexe CMH I-peptide à la surface cellulaire :** Les molécules de CMH I et le peptide sont transportés à la membrane via le Golgi et présentés au LT CD8+.

## **b. CMH II et peptides exogènes**

Les molécules du CMH II sont **restreintes** aux CPA (macrophages, DC et lymphocyte B) mais peuvent être exprimées sur de nombreuses cellules après activation notamment chez l'homme. Ces molécules du CMH II sont spécialisées dans la présentation de peptides provenant du milieu extracellulaire, dits **exogènes**, aux LT CD4+. Ces peptides proviennent de la dégradation de virus, bactéries, corps apoptotiques ou nécrotiques ou d'organelles endommagées via l'autophagie. Les Ag extracellulaires sont internalisés dans des vésicules appelées **phagosomes** qui vont fusionner avec des **lysosomes** pour former des **phagolysosomes**. La dégradation de l'Ag est effectuée par des protéases contenues dans des lysosomes, des compartiments très acides. Les peptides ainsi obtenus peuvent interagir avec les molécules du CMH II. Ainsi associées, les molécules du CMH II sont transportées à la surface de la cellule où elles pourront être reconnues par les LT CD4+ de manière peptide spécifique (Figure 5).

### c. Présentation croisée de peptides exogènes sur le CMH I

Les molécules du CMH II ne sont pas les seules à pouvoir présenter des peptides exogènes. En effet il est connu que les molécules de CMH I pouvaient également les présenter. Cette propriété atypique est appelé **présentation croisée** (Bevan, 1976) et est assurée par les DC et les macrophages. Néanmoins les voies par lesquelles les antigènes exogènes accèdent aux molécules du CMH I restent floues. Plusieurs **hypothèses** sont avancées. Il pourrait y avoir transfert de peptides entre les cellules par des **jonctions GAP** (Neijssen et al., 2007). Certains travaux suggèrent aussi que la machinerie de dislocation du RE pourrait permettre le passage de peptides du phagosome vers le cytosol et ainsi permettre leur entrée dans la voie de présentation sur le CMH I (Houde et al., 2003). Les bicouches lipidiques ne sont pas des **barrières passives** séparant un compartiment d'un autre. Il a été montré qu'elles pouvaient participer au transport de peptides d'un côté à l'autre de la bicouche sans forcément l'intervention d'un récepteur ou d'une protéine quelconque (Ploegh, 2007). Cela permettrait également le passage de peptides du phagosome ou du RE vers le cytosol (Figure 5).



**Figure 5 - Les voies de présentation antigénique dans les DC** (D'après Villadangos, Nat. Rev. Immunol., 2007). Les molécules de CMH de classe I présentent des peptides dérivés de protéines endogènes dégradées par le protéasome dans le cytosol. Les molécules de CMH de classe II acquièrent des peptides générés par dégradation protéolytique de protéines exogènes dans les endosomes. Les molécules du CMH ce classe II peuvent aussi présenter des peptides issus de la dégradation de composants endogènes comme des protéines de la membrane plasmique, de la voie

endocytique ou encore des protéines du cytosol accédant aux endosomes par autophagie. Certaines DC ont la capacité de présenter sur les molécules de CMH I des peptides exogènes. Ce phénomène est appelé présentation croisée.

#### **d. Présentation sur les molécules CD1**

Le CD1 est une famille de molécules ressemblant aux molécules de CMH I. On en distingue deux classes. On connaît tout d'abord celles reconnues par les LT conventionnels (**CD1a, b, c, e**) qui présentent des **antigènes lipidiques**. Le **CD1d** quant à lui est seulement reconnu par les LT dits "**Natural Killer**" (NKT). En se liant ainsi à des lipides, les protéines CD1 diversifient l'éventail de molécules issues de pathogènes que le système immunitaire peut reconnaître (Watts, 2004). De plus, le CD1d joue un rôle dans la régulation antitumorale et autoimmune par la présentation de lipides du soi, bien qu'on en sache encore peu sur ces ligands lipidiques (Brigl et Brenner, 2004; Joyce et Van Kaer, 2003).

#### **Vers une cellule présentatrice d'antigènes professionnelle**

La DC est maintenant arrivée à un stade où elle va devoir quitter son état immature, subir des **modifications morphologiques, phénotypiques** et **fonctionnelles** afin de passer d'une cellule capturant des antigènes à une CPA professionnelle et mature. La maturation d'une DC est intimement liée à sa migration des tissus périphériques vers les organes lymphoïdes secondaires (OLS). C'est pourquoi je les aborderai dans la même partie.

#### **a. Activation et maturation des DC**

L'activation d'une DC peut être induite par différents signaux de danger :

- Des molécules spécifiques exprimées à la surface des pathogènes appelés **PAMP (pathogen associated molecular pattern)**. Ces PAMP sont des molécules conservées au cours de l'évolution présentes sur les pathogènes. Toutefois il a récemment été proposé de les renommer **MAMP** pour **microbe-associated molecular pattern** puisque ces molécules peuvent aussi être retrouvées sur des micro-organismes. Les MAMP sont des **ARN** ou **ADN bactériens** ou **viraux**, des **lipopolysaccharides** (LPS) (composant la paroi des bactéries Gram négative), des peptidoglycanes, la flagelline, des phospholipides. Cette liste est loin d'être exhaustive. Ces MAMP sont reconnus via les nombreux récepteurs que les DC expriment, que l'on nomme **pattern recognition receptor** (PRR) comme les TLR. Les TLR induisent deux voies de signalisation différentes dépendantes ou non de la protéine **MyD88** en fonction de leur

ligand (Kawai et Akira, 2010). Les DC peuvent aussi être activées via d'autres PRR comme les hélicases à ARN (**RIG-1**, **mad-5**), les protéines **NOD** (Nucléotide binding oligomerization domain) (Meylan et al., 2006), les **MR** et enfin les **CLR**.

- Des **cytokines inflammatoires** comme le facteur de nécrose des tumeurs alpha (en anglais Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (**TNF- $\alpha$** )), l'interleukine 1 (**IL-1**), l'**IL-6**, et l'interféron alpha (**IFN- $\alpha$** ) (Matzinger, 2002)

- Des signaux provenant de cellules nécrotiques ou endommagées (**HSP60**, **HSP70**) ou après des lésions tissulaires pouvant induire la dégradation du **fibrinogène**

La voie de signalisation dépendante de MyD88 ressemble à celle du récepteur à l'IL-1 tandis que celle indépendante de MyD88 passe par un autre adaptateur du domaine TIR : **TRIF** (*TIR domain-containing adaptator inducing IFN- $\beta$* ) (Kawai et Akira, 2007).

Une fois activée, la DC va entamer son processus de maturation qui va lui imposer des modifications morphologiques. Elle va en effet perdre sa capacité d'adhésion et acquérir ainsi une **forte motilité** cellulaire. Elle va aussi réorganiser son cytosquelette et former de **longues dendrites**, augmentant ainsi considérablement la surface de contact possible avec les LT (Winzler et al., 1997). Des modifications phénotypiques vont également avoir lieu. En effet, elle va surexprimer les molécules de costimulation telles que **CD40**, **CD80** et **CD86** ainsi que d'autres membres de la famille du TNF (Watts, 2005). Elles vont aussi avoir une expression des **molécules de CMH II** à leur surface plus importante. Les complexes CMH-peptides vont par ailleurs avoir une demi-vie plus importante. Elles vont aussi fortement exprimer le **CCR7**, un récepteur de chimiokines, qui va jouer un rôle dans leur migration vers les OL (Förster et al., 2008).

La DC va subir d'importants changements fonctionnels. Elle va en effet connaître une forte diminution de son pouvoir de capture des antigènes (Théry et Amigorena, 2001). Des modifications de ses compartiments lysosomiaux vont également avoir lieu, avec la diminution de l'expression du **CD68** et la surexpression de la protéine **DC-LAMP** conduisant à une augmentation de la présentation antigénique sur le CMH II (Barois et al., 2002). Elles vont aussi sécréter des facteurs solubles pouvant agir sur d'autres cellules de l'immunité comme **l'IL-12** et **l'IL-23** (Dubsky et al., 2005).

Il a été communément accepté que la maturation des DC était étroitement liée à leur migration et à leur pouvoir d'activer les LT naïfs. Ce dogme n'est plus aujourd'hui aussi clair. En effet, il a été montré que des DC arrivaient **continuellement** dans les OL transportant des

fragments de cellules apoptotiques. Ces cellules peuvent stimuler les LT mais n'induisent pas de réponse immunitaire via les LT (Huang et al., 2000) mais au contraire induisent une **tolérance** (Heath et al., 2004). De plus de nombreuses DC dans les OLS sont dans un état immature (Wilson et Villadangos, 2004) et ne sont pourtant pas dépourvues de capacité migratoire.

### b. Migration vers les organes lymphoïdes secondaires

Au cours de leur maturation, les DC vont migrer vers les OLS notamment les ganglions lymphatiques où elles pourront finaliser leur maturation et initier une réponse immune spécifique (Cyster, 1999; Sallusto et al., 1999). La migration des DC à travers les tissus est dépendante d'une cascade d'évènements incluant la production de chimiokines, de petits polypeptides contrôlant l'adhésion et le chimiotactisme des cellules, l'activation des récepteurs à ces chimiokines ainsi que la régulation des molécules d'adhésion (Cavanagh et Von Andrian, 2002). Il faut noter que les différentes populations de DC n'expriment pas toutes le même répertoire de récepteurs aux chimiokines ce qui leur donne à toutes une capacité migratoire différente. En effet, les DC peuvent migrer vers les tissus inflammés, les OLS, la rate, la moelle osseuse ou bien le thymus (Tableau 3).

**Tableau 3 - Les récepteurs impliqués dans le chimiotactisme exprimés par les DC humaines.** -  
 , ±, + et ++ indiquent l'expression relative de chaque récepteur. ND signifie Non Déterminé.

Récepteur	cDC		pDC	
	Expression	Fonctionnel	Expression	Fonctionnel
<b>CCR1</b>	±	oui	±	non
<b>CCR2</b>	++	oui	++	non
<b>CCR4</b>	+	oui	+	non
<b>CCR5</b>	+	oui	++	non
<b>CCR6</b>	±	oui	±	non
<b>CCR7</b>	+	oui	+	oui
<b>CXCR3</b>	+	oui	++	oui
<b>CXCR4</b>	++	oui	++	oui
<b>FÜR</b>	++	oui	+	non
<b>FPRL1</b>	++	oui	ND	non
<b>FPRL2</b>	++	oui	-	non
<b>ChemR23</b>	+	oui	++	oui
<b>PAFR</b>	+	oui	ND	non
<b>C5aR</b>	+	oui	ND	ND

D'après Del Prete, Thromb Haemost, 2006

La première étape est l'**adhésion** des DC aux **cellules endothéliales** (EC) et le passage au travers de la membrane basale et du réseau de collagène. Cette étape est dépendante de l'activation d'intégrines comme les **intégrines  $\beta 2$**  (LFA-1, Mac-1, p150,95) et  **$\beta 1$**  (VLA-4 et VLA-5) (D'Amico et al., 1998) exprimées par les DC. Le passage au travers de la membrane est quant à lui dépendant du **CD31** qui est exprimé au niveau des jonctions intercellulaires des EC. Il faut toutefois noter que l'activation de la DC modifie son répertoire d'expression de récepteurs aux chimiokines. Après activation elles expriment CCR7 dont les ligands, CCL19 et CCL21, sont exprimés par les EC lymphatiques et dans les zones T des OLS comme la rate et les ganglions lymphatiques (Dieu et al., 1998). En l'absence de CCR7, les DC ne migrent pas vers les OLS (Ohl et al., 2004). C'est donc un récepteur de chimiokine indispensable à la migration de DC vers les OLS. Une fois dans la lymphe afférente, le mécanisme par lequel les DC se déplacent dans le système lymphatique reste méconnu. Comme est aussi méconnu le mécanisme par lequel les DC se frayent un passage au travers du parenchyme très dense des ganglions lymphatiques (en anglais lymph nodes (LN)). CCR7 joue néanmoins un rôle important dans l'**attraction** des DC au cœur des **zones T** où sont exprimés CCL19 et CCL21 et où elles pourront attirer les LT et les lymphocytes B (LB) (Dubsky et al., 2005). Les DC vont également attirer d'autres DC matures.

Les DC vont maintenant pouvoir jouer leur rôle de lien entre l'immunité innée et adaptative et induire l'activation des LT.

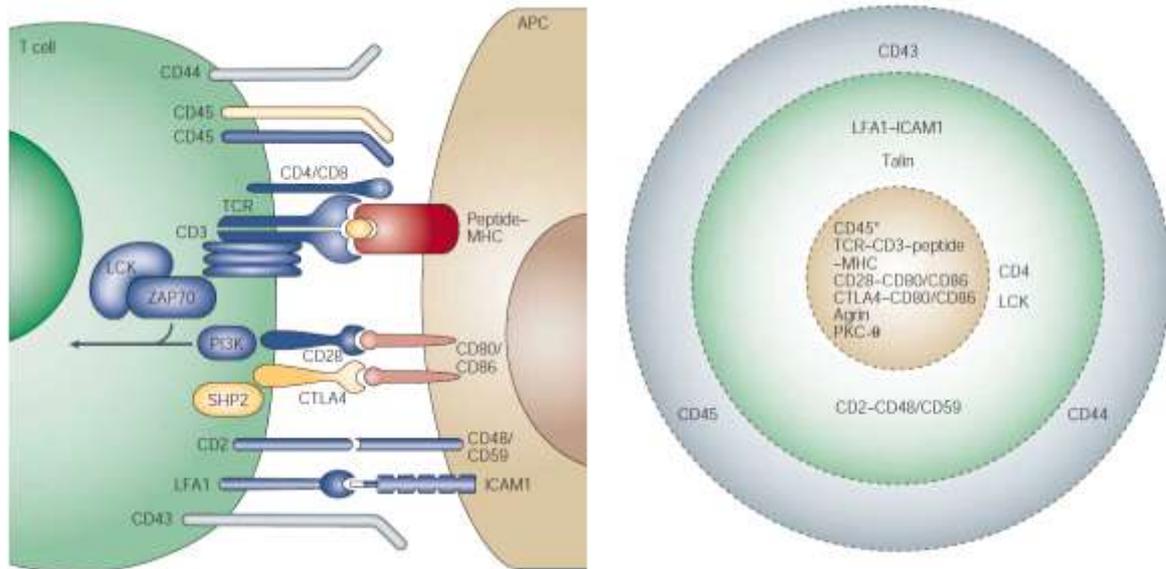
## **Activation des Lymphocytes T**

Il ne suffit pas aux DC d'être arrivées dans les zones T des LN pour juste entrer en contact avec les LT et les activer. Le déclenchement d'une réponse adaptative est bien plus complexe. En effet, le **type de molécule** entrant en jeu dans le contact, la **force** et la **durée** de ce contact jouent un rôle très important dans le type de réponse que la DC va déclencher chez le LT. La zone de contact entre les deux cellules est appelé **synapse immunologique**.

### **a. La synapse immunologique**

La définition initiale de la synapse immunologique (en anglais *Immunological Synapse* (**IS**)) comme étant une structure stable a évolué en un concept beaucoup plus **dynamique**. La définition classique de la IS est basée sur une interface entre deux cellules où les protéines

**LFA-1** (leucocyte function-associated antigen-1) sur le LT et **ICAM-1** sur la DC forment un anneau autour d'un **cluster central** composé du récepteur du LT, ou **TCR**, qui reconnaît un **complexe CMH-peptide**. Ces structures ont été définies comme des **clusters d'activation supramoléculaires** (en anglais *supramolecular activation cluster (SMAC)*). Le TCR représente le centre (**cSMAC**) et l'anneau de LFA-1 la périphérie (**pSMAC**) (Monks et al., 1998) (Figure 6).



**Figure 6- La synapse immunologique.** A gauche, vue latérale de la synapse avec les différentes interactions entrant en jeu. A droite, vue de face de la synapse immunologique avec en marron le cSMAC, en vert l'anneau périphérique pSMAC et en gris l'anneau distal dSMAC. D'après Huppa, Nat Rev Immunol, 2003.

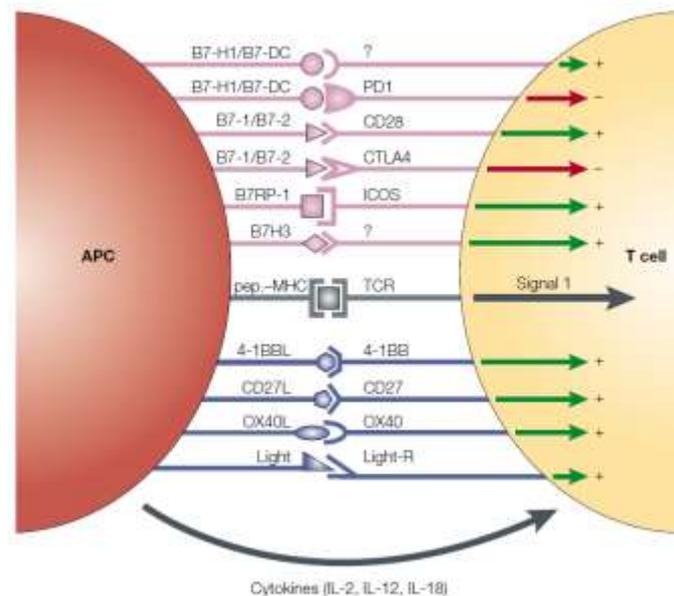
Le premier contact initiant la stabilité de cette synapse se fait par l'interaction de **molécules d'adhérence** comme **DC-SIGN** (CD209) sur certaines DC qui va se lier à **ICAM-3** (CD50) sur le LT naïf avec une grande affinité (Geijtenbeek et al., 2000b). Vient ensuite l'interaction entre **LFA-1 / ICAM-1** et **CD2 / CD58** qui vont stabiliser le contact entre les deux cellules (Wang et al., 1999). En périphérie du cSMAC on retrouve aussi la **taline** sous-membranaire. Le pSMAC est quant à lui composé de grandes molécules comme le **CD43**, **CD44** et **CD45** qui sont des glycoprotéines. Toutes ces molécules d'adhérence entourent le cSMAC qui est composé du **TCR-CD3** (CD4/CD8) reconnaissant spécifiquement un complexe CMH/peptide. On y retrouve aussi les molécules de costimulation (décrites ci-dessous). A cet endroit, il y a aussi accumulation sous la membrane de **protéines kinase C-θ** (PKCθ).

Pour induire un signal d'activation complet au LT, la DC doit générer 3 signaux.

- **Signal 1** : Reconnaissance du complexe CMH-peptide par un TCR spécifique associé au CD3. Si le LT ne reconnaît pas les complexes CMH-peptide dont il est spécifique, il va à la rencontre d'une autre DC.

- **Signal 2** : Intervention des molécules de costimulation. On en distingue deux familles, la superfamille des **B7-CD28** et celle des **récepteurs au TNF (TNFR)**. Dans la première famille, on connaît tout d'abord **B7.1** (CD80) et **B7.2** (CD86) qui sont surexprimés lors de l'activation des DC (Hathcock et al., 1994). C'est deux protéines sont reconnues par les mêmes récepteurs, un activateur, **CD28**, et un inhibiteur, **CTLA-4** (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4) (CD152), présents sur le LT. CTLA-4 est exprimé dès la stimulation du LT pour bloquer l'activation excessive des LT, moduler leur réponse et éviter tout risque de réponse trop violente qui pourrait engendrer des **maladies autoimmunes** (Leach et al., 1996; Walunas et al., 1996). Dans cette même famille entre la molécule **ICOS**, qui est induite sur le LT après son activation et entraîne la production de facteurs solubles, jouant un rôle dans la **polarisation de la réponse T** (Beier et al., 2000), c'est à dire dans la différenciation des T naïfs en T activés produisant différentes cytokines suivant le profil qu'ils vont adopter. Son ligand est **ICOSL**. On trouve également **PDL-1** (B7-H1) et **PDL-2** (B7-DC) exprimés sur la DC qui ont une action inhibitrice via leur récepteur sur le LT, **PD1** (Programmed cell death 1 receptor), qui est exprimé après activation du LT (Sharpe et Freeman, 2002; Folkl et Bienzle, 2010). La famille des récepteurs au TNF compte six couples dont les récepteurs sont exprimés sur les LT naïfs et les ligands sur la DC. Elle est composé de **CD40**, **OX40**, **4-1BB**, **CD27**, **CD30**, **HVEM** (aussi appelé **LIGHT-R**) et **TRANCE** (TNF-related activation-induced cytokine) dont les ligands sont respectivement **CD40L**, **OX40L**, **4-1BBL**, **CD70**, **CD30L**, **LIGHT** et **RANK** (receptor activator of NF- $\kappa$ B). Cette famille induit l'augmentation de la production de cytokines et la prolifération des LT (Croft, 2003) (Figure 7).

- **Signal 3** : Les deux premiers signaux à eux seuls peuvent suffire à induire une prolifération des LT mais cette réponse n'est pas suffisamment efficace. Pour avoir une réponse vraiment efficace il faut un troisième signal apporté par les **cytokines** produites par les LT ou la DC, ou présente dans l'environnement proche du LT, qui vont entraîner une forte prolifération des LT et leur différenciation. Parmi ces cytokines on trouve **l'IL-4**, **-6**, **-12** et **-18** et le **TNF- $\alpha$**  (Figure 7). Mais la cytokine principale reste **l'IL-2** qui a un fort pouvoir prolifératif sur les LT (Malek et Bayer, 2004).



**Figure 7 - Les molécules de co-stimulation.** Schématisation des molécules de co-stimulation de la famille B7-CD28 (en rose) et de la famille des récepteurs au TNF (en bleu) ainsi que des signaux stimulateurs (en vert) ou inhibiteurs (en rouge) qu'elles induisent. D'après Pardoll, Nat Rev Immunol, 2002

L'achèvement de cette synapse intervient par l'**internalisation du TCR** suite à l'activation (Liu et al., 2000), par la **perte de molécules d'adhésion** comme LFA-1 (Mazerolles et al., 1996), par l'augmentation d'expression de **molécules inhibitrices** comme le CTLA-4. À ce moment là, l'induction locale de chimiokines ou de leurs récepteurs réduit la stabilité de la synapse et entraîne la **mobilité** du LT activé. Un autre évènement déstabilisant la IS est la redistribution membranaire de molécules d'adhésion comme le CD43 (Friedl et al., 2005).

Il a été démontré récemment que cette synapse permettait aussi la **survie de la DC** en retardant son **apoptose** (Rodríguez-Fernández et al., 2010).

Si cette visualisation de la synapse est accepté par beaucoup, elle en reste néanmoins réductrice, figée et ne tient pas compte du caractère **fluide** et **dynamique** de la synapse et de la multiplicité des signaux échangés entre les deux partenaires variant au cours du contact entre les deux cellules (Friedl et al., 2005).

Le lymphocyte T naïf ainsi activé va pouvoir se différencier. Cette différenciation dépend de facteurs solubles, mais aussi de la force de l'interaction entre la DC et le LT ainsi que de la quantité d'Ag présentés à la surface de la DC. Cela affecte la nature de la cascade de signalisation induite dans le LT et par conséquent intervient dans le profil que le LT adoptera. On distingue différents profils dits  $T_H$  dont les trois principaux sont  $T_{H1}$ ,  $T_{H2}$  et  $T_{H17}$ .

## b. Vers des lymphocytes dits T<sub>H</sub>

Les différentes classes de L<sub>T</sub> peuvent être identifiées sur le répertoire de cytokines qu'elles produisent. On connaît les profils **T<sub>H</sub>1**, **T<sub>H</sub>2** et **T<sub>H</sub>17** (Tableau 4).

- **T<sub>H</sub>1** : Les cytokines induisant un profil T<sub>H</sub>1 sont tout d'abord l'**IL-12** qui joue un rôle primordial (Manetti et al., 1993). En effet elle induit l'expression du facteur de transcription T-box exprimé dans les LT (**T-bet**) qui est le facteur essentiel responsable de la différenciation en T<sub>H</sub>1. Il y aussi l'**IL-18**, **-27** et l'**IFN-γ**. L'IFN-γ agit comme inhibiteur de l'engagement vers un profil T<sub>H</sub>2 ou T<sub>H</sub>17. L'IL-18 entraîne la surexpression du récepteur à l'IL-12 favorisant ainsi le profil T<sub>H</sub>1. L'IL-27 active aussi l'expression du facteur de transcription T-bet via STAT4 (Commins et al., 2010). Ces T<sub>H</sub>1 produisent principalement de l'IFN-γ, du TNF-β et de l'IL-2.

- **T<sub>H</sub>2** : Pour une différenciation en T<sub>H</sub>2, la cytokine indispensable est l'**IL-4** qui entraîne l'expression du facteur de transcription **GATA-3**, essentiel à la différenciation en T<sub>H</sub>2. L'IL-4 inhibe au passage l'expression de T-bet. L'**IL-19** est également impliqué dans cette différenciation (Gallagher et al., 2004) ainsi que l'**IL-33** et la lymphopoïétine stromale thymique (**TSLP**) (Schmitz et al., 2005; Wang et al., 2006). Ces T<sub>H</sub>2 produisent principalement de l'**IL-4**, **-5**, **-9**, **-13** et du **TNF-α**. Il a été récemment décrit une sous-classe de T<sub>H</sub>2, les **T<sub>H</sub>9**, qui sont caractérisés par une production principale d'**IL-9**. Ils se différencient parallèlement aux T<sub>H</sub>2 en présence de **TGF-β** et seraient impliqués dans les réponses contre les helminthes (Veldhoen et al., 2008; Dardalhon et al., 2008).

- **T<sub>H</sub>17** : Les deux cytokines primordiales pour la différenciation en ce profil sont l'**IL-6** et le **TGF-β** (Mangan et al., 2006). L'**IL-21** et **-23** quant à elles assurent leur expansion. Ce profil a été décrit plus récemment et comporte une voie de signalisation distincte des deux autres profils et les régule négativement. C'est pourquoi les T<sub>H</sub>17 sont considérés comme sous-population distincte. Leur facteur de transcription propre est le **RORγT**.

**Tableau 4 - Les différents profils T<sub>H</sub>**

Profil T <sub>H</sub>	Répertoire de cytokines	Cytokines impliqués dans la différenciation
<b>T<sub>H</sub>1</b>	IFN-γ, TNF-α, TNF-β, GM-CSF, IL-2, IL-3	IL-12, IL-18, IL-27, IFN-γ
<b>T<sub>H</sub>2</b>	IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-24, IL-25, IL-31, TNF-α, GM-CSF	IL-4, IL-19, IL-25, IL-33, TSLP
<b>T<sub>H</sub>3</b>	TGF-β, IL-10	
<b>T<sub>H</sub>9</b>	IL-4, IL-9	TGF-β
<b>T<sub>H</sub>17</b>	IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22	IL-6, TGF-β, IL-21, IL-23

D'après Commins, [J Allergy Clin Immunol](#), 2010

Ces trois profils sont principalement importants pour combattre les pathogènes intracellulaires ( $T_H1$ ), les helminthes ( $T_H2$ ) et les bactéries/champignons extracellulaires ( $T_H17$ ). Les  $T_H1$  et  $T_H17$  sont impliqués dans de nombreuses maladies autoimmunes alors que les  $T_H2$  contribuent aux réponses allergiques (Zhu et Paul, 2008).

### c. Vers des lymphocytes dits régulateurs

A coté des lymphocytes  $T_H$  traditionnels, on connaît maintenant d'autres familles de lymphocytes dits **régulateurs** (Treg). Elles comportent des Treg différenciés en périphérie et produisant de l'IL-10 appelés **Treg induits (iTreg)** qui sont CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> (Chen et al., 2003), des Treg dits **naturels (nTreg)** ayant le même phénotype et dérivés du thymus ainsi que des  **$T_H3$**  produisant du TGF- $\beta$  (Tableau 4).

- **Les nTreg** sont générés en réponse à l'expression dans le thymus d'**autoAg** et jouent un rôle important pour prévenir l'**autoimmunité**. Ils expriment constitutivement la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL2 (**CD25**) et leur facteur de transcription spécifique est **Fox-p3**. Ils produisent de l'**IL-10** mais c'est le **TGF- $\beta$  membranaire** qu'ils expriment qui semble médier, au moins en partie, leur fonction **suppressive**. Cette fonction suppressive réside dans le blocage de la prolifération des T<sub>eff</sub> ainsi que de leur capacité à produire des cytokines. Étonnamment, Ces nTreg semblent aussi impliqués dans la tolérance à des Ag non présentés dans le thymus comme des allergènes par exemple.

- **Les  $T_H3$**  sont initialement dérivés de l'intestin et induisent la **tolérance** des muqueuses aux nombreux Ag présents dans le tube digestif comme les Ag alimentaires. Leur capacité à produire du TGF- $\beta$  leur fait jouer un rôle dans la production **d'IgA sécrétoires** (Saurer et Mueller, 2009). Leur présence dans les bronches, où les muqueuses sont souvent en contact avec des Ag extérieurs, a souvent été supposée mais pas encore confirmée. Ces lymphocytes restent encore peu connus. Une étude a toutefois montré que leur nombre était fortement réduit chez les patients atteints du syndrome coronaire aigu (Ji et al., 2009)

- **Les iTreg** proviendraient de la différenciation de T effecteurs ( $T_{eff}$ ) préexistants ou de LT naïfs circulants. Cela reste encore flou. Toutefois ils sont bien caractérisés pour leur production d'**IL-10** (Nicolson et al., 2006). De plus, ces cellules jouent un rôle important en diminuant la réactivité de LT spécifiques d'allergènes après une immunothérapie (Akdis et al., 1998; Francis et al., 2003).

#### d. Vers la tolérance

Une des tâches les plus importantes du SI est de différencier les Ag du soi et du non-soi. Cette distinction est primordiale pour éviter l'induction de réponse immunitaire dirigée contre des composants du soi, entraînant des maladies auto-immunes. Pour cela il faut qu'il y ait ce qu'on appelle une **tolérance aux Ag du soi**. La tolérance centrale est la **sélection négative** dans le thymus des LT auto-réactifs par présentation d'autoAg sur des DC matures et la sélection négative des LB auto-réactifs dans la moelle osseuse. Malheureusement cette déplétion n'est pas efficace à 100% et des LT auto-réactifs peuvent atteindre la périphérie. C'est pourquoi il y a aussi une tolérance périphérique qui intervient par différents mécanismes.

**L'ignorance** est le fait que certains LT ne puissent pas entrer en contact avec l'Ag dont ils sont spécifiques en raison d'une **barrière physiologique** par exemple (Naquet et al., 1988). Il arrive aussi que des LT ignorent simplement les Ag dont ils sont spécifiques.

**La délétion** est l'élimination par **apoptose** de clones T auto-réactifs par la voie **FAS-FASL**. Ces LT reconnaissent leur Ag spécifique mais en absence de signal de costimulation ou alors présenté sur des DC semi-matures ou immatures. En effet il a été montré que le niveau d'activation et de maturation de la DC jouait un rôle important dans l'induction de tolérance (Steinman et Nussenzweig, 2002).

**L'anergie** est un état de paralysie fonctionnelle dans lequel peut aussi se retrouver un LT après reconnaissance de son Ag spécifique présenté par une DC immature (Falb et al., 1996).

Les DC peuvent aussi induire une tolérance de manière indirecte via la différenciation de **iTreg**. Ces Treg entraînent l'**inhibition** de l'activation et de la prolifération des LT<sub>eff</sub>. Ils peuvent aussi entraîner l'apoptose de ces LT (Vercoulen et al., 2009).

#### Les populations de cellules dendritiques

Les cellules dendritiques ne peuvent être regroupées en une famille homogène de cellules. En effet, il a été décrit de nombreuses populations de DC différant tant sur leur phénotype que sur leur localisation dans l'organisme et leur fonction. Les DC dites "conventionnelles" (cDC) sont des DC résidant dans la plupart des tissus de l'organisme. On distingue les DC résidentes des OL qui ne migrent pas et les DC des tissus non-lymphoïdes qui elles ont la capacité à migrer vers les ganglions lymphatiques.

## Les DC résidentes des organes lymphoïdes

Les DC résidentes des OL comme la rate, chez la souris, sont caractérisées par leur expression du **CD11c** et des molécules du **CMH II**. On différencie plusieurs sous-populations en fonction de leur expression de **CD4**, **CD8**, **CD205** et **CD11b**. Trois sous-populations sont donc décrites : les **DC CD4+ aussi appelé DC CD8-**, les **DC CD8+**, et les **DC CD4- CD8-** dites **double négatives** (DN) (Vremec et al., 2000).

Chez l'homme ces populations expriment aussi le CD11c et sont différenciées par l'expression des **Blood Dendritic Cell Antigen (BDCA)**. En effet une population exprime le **BDCA-1** (CD1c) et est appelée **DC1**, l'autre exprime le **BDCA-3** (CD141) et est appelée **DC2**.

Quant au rat, ces DC expriment également CD11c et sont différenciées par leur expression du CD103 et l'expression du CD103 et du CD4. En effet une population est CD103+ CD4- et l'autre est CD103low CD4+, CD103low CD4+, appelées respectivement DC CD4- et DC CD4+ (Trinite et al., 2000) (

Tableau 5).

**Tableau 5 - Phénotypes des DC conventionnelles résidentes des organes lymphoïdes.** -, ±, +, ++ et +++ indiquent l'expression relative de la protéine de chaque marqueur. ND signifie Non Déterminé.

	Homme		Souris			Rat	
	DC1	DC2	DC CD4+	DC CD8+	DC DN	DC CD4+	DC CD4-
<b>CD11c</b>	++	+	+++	+++	+++	+	+
<b>CD1c</b>	+	-	ND	ND	ND	ND	ND
<b>CD4</b>	+	+	+	-	-	+	-
<b>CD5</b>	+	±	ND	ND	ND	+	-
<b>CD8</b>	-	-	-	+	-	-	-
<b>CD11b</b>	±	-	++	-	++	+	+
<b>CD103</b>	ND	ND	-	-	-	+	++
<b>CD141</b>	-	+	ND	ND	ND	ND	ND
<b>CD205</b>	+	+	-	++	±	ND	ND
<b>SIRPa</b>	ND	ND	+	-	+	+	-
<b>CMH II</b>	++	+	++	++	++	+	+

D'après Villadangos, Nat Rev, 2007; Ju, Meth Mol Bio, 2010; Voisine, J Immunol, 2002

Il faut noter qu'il y a une correspondance des populations entre les différentes espèces. En effet, les DC2 CD141+ correspondraient aux DC CD8+ chez la souris (Villadangos et Shortman, 2010) et aux DC CD4- du rat.

## Les DC des tissus non-lymphoïdes

Ces DC sont retrouvées dans les tissus non-lymphoïdes mais aussi dans les tissus lymphoïdes où elles vont migrer et correspondent principalement les DC de la peau.

La peau est la première barrière contre les pathogènes. On connaît bien sûr les **cellules de Langerhans** (LC) qui ont été les premières DC décrites et sont caractérisées par l'expression de la **langerine**, un CLR de type II. Elles sont présentes dans les couches de l'épiderme. Mais ce ne sont pas les seules DC de la peau. En effet on connaît aussi une population de DC dite **dermale** ou **interstitielle**, présente dans les couches du derme. Les deux populations épidermales et dermales expriment le **CD11c** et les molécules du **CMH II**. Les LC humaines expriment la **langerine** (CD207), **CD1a** et l'E-cadherine et ont une structure intracellulaire bien spécifique composée de **granules de Birbeck** qui ne sont retrouvées dans aucune autre population de DC (Valladeau et al., 2000b). Ces granules sont remplies de langerine et joueraient un rôle dans l'endocytose des Ag. Les DC dermales quant à elles n'expriment pas la langerine ni la E-cadherine chez l'homme et expriment deux marqueurs différents des LC : le **MR** (CD206) et **DC-SIGN** (CD209). Elles ont aussi un phénotype **plus mature** que les LC (McLellan et al., 1998). Chez la souris, on a identifié une population supplémentaire de DC dermales qui expriment la langerine. On a donc les LC, qui sont bien sûr **Langerine+** mais aussi **EpCam+ CD205+** et composées de granules de Birbeck. Les deux populations de DC dermales chez la souris se différencient par l'expression ou non de la **langerine**, **CD205**, **CD103** et **F4/80** (un marqueur des macrophages) (Tableau 6). Au repos, les LC **migrent** constamment vers les OLS (Hemmi et al., 2001). Ce qui n'est pas le cas des DC dermales qui ne migrent vers les OLS que après capture d'Ag. De plus, chez la souris, il a été montré que les LC étaient douées de cross-présentation aux LT CD8+ (Stoitzner et al., 2006), ce qui n'a pas été démontré chez l'homme.

**Tableau 6 - Les populations de DC de la peau chez l'homme et la souris.** -, ±, + et ++ indiquent l'expression relative de la protéine de chaque marqueur. ND signifie Non Déterminé.

	Human		Mouse		
	LC	Dermal DC	LC	Dermal DC	
				langerine+	langerine-
<b>Langerine</b>	+++	-	+++	++	-
<b>Granules de Birbeck</b>	++	-	++	-	-
<b>CMH II</b>	++	++	++	++	++
<b>CD1a</b>	+++	++	-	-	-
<b>CD11c</b>	+	+	+	++	++
<b>CD103</b>	ND	ND	-	++	-
<b>CD205</b>	-	-	++	-	++
<b>F4/80</b>	ND	ND	+	-	+
<b>E-cadherin</b>	++	-	++	ND	ND
<b>EpCAM</b>	+	-	++	-	-

D'après Merad M., Nat Rev, 2008

Il a également été décrit des DC dans les poumons, les reins (Krüger et al., 2004), le foie, le cerveau, les yeux (Xu et al., 2007), l'appareil digestif.

### **Les DC plasmacytoïdes**

Les pDC sont une population de DC bien spécifiques retrouvées sous forme immature dans le sang périphérique et les organes lymphoïdes. On les retrouve en plus grand nombre dans les **tissus inflammés** et les **amygdales**. Leur caractéristique majeure est qu'elles sont les principales productrices **d'IFN de type 1** après stimulation. Le répertoire de TLR qu'elles expriment, **TLR7** et **9** majoritairement, les rend réactives aux infections virales. Chez l'homme elles sont caractérisées par l'expression du **BDCA-2** et du **BDCA-4** (Dzionek et al., 2000), en revanche elles n'expriment pas le **CD11b**, **CD11c**. Chez la souris elles sont caractérisées par un phénotype **Ly6C+ B220+** et **CD4+** (Asselin-Paturel et al., 2001a). Et chez le rat, elles sont **CD103- CD11b- CD4<sup>high</sup> CD45R+** (Hubert et al., 2004). Je ne détaillerai pas plus cette partie. Les pDC feront l'objet de toute la seconde partie de mon introduction de thèse.

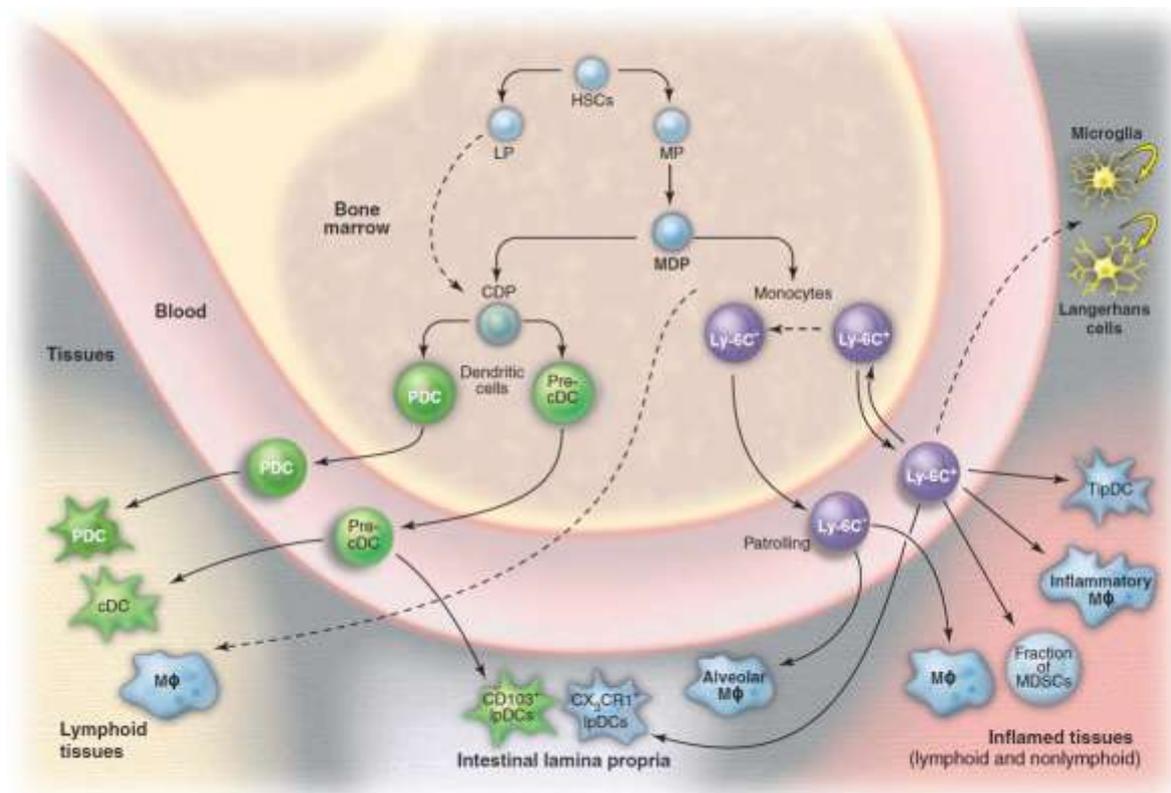
### **Les DC inflammatoires**

Difficilement détectables dans un organisme en bonne santé, les DC inflammatoires sont une population hétérogène dont la présence trahit une infection bactérienne. La population la plus décrite est la DC produisant du **TNF/iNOS (Tip-DC)** (Serbina et al., 2003). Initialement découvertes dans la rate de souris infectées par la *Listeria monocytogenes* (Serbina et al., 2003) ou par *E. Coli* (Engel et al., 2006), ces Tip-DC ne sont pas indispensables au déclenchement d'une réponse T mais sont importantes pour enrayer certaines infections bactériennes. Elles ont aussi été identifiées chez l'homme dans les plaques de lésions psoriasiques (Lowes et al., 2005).

La description des ces différentes populations de DC est loin de refléter la **complexité du réseau des DC** dans l'organisme et leur localisation. En effet une DC peut être conventionnelle, résidente des OLS et migratoire, ou résidente des organes non-lymphoïdes, et migratoire. Suivant qu'on les définit par leur localisation, leur fonction ou par leur phénotype, les différentes populations s'entrecroisent.

## Ontogénèse des cellules dendritiques

L'ontogénie des DC a longtemps été le sujet de controverse notamment au niveau des voies conduisant au cDC et au pDC. En effet, à leur découverte, les pDC avaient été proposées d'**origine lymphoïde** en raison de leur morphologie. Mais rapidement il a été démontré qu'elles pouvaient venir d'un progéniteur commun à la lignée lymphoïde (**CLP**) tout comme de progéniteur commun à la lignée myéloïde (**CMP**) (D'Amico et Wu, 2003; Shigematsu et al., 2004a). Toutefois des zones d'ombres persistaient notamment au niveau de l'existence d'un progéniteur éventuel spécifique aux pDC, ainsi que les voies exactes de différenciation des différents progéniteurs. C'est, de nos jours, beaucoup plus clair même s'il reste encore et toujours d'hypothétiques remises en question du modèle.



**Figure 8 - Différenciation des DC et des macrophages chez la souris.** D'après Geissmann, Science, 2010. Dans la moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques (HSCs) produisent les progéniteurs communs aux lignées lymphoïde (LP) et myéloïde (MP). Ce MP génère les monocytes, des macrophages et le précurseur commun aux DC (CDP). Deux populations de monocytes, Ly-6C positive ou négative, quittent la MO pour entrer dans le sang. Le CDP se différencie en précurseur de DC conventionnel (cDC) et en pDC. Les précurseurs de cDC circulent dans le sang pour rejoindre les tissus lymphoïdes où ils donneront les cDC CD8+ et CD8-. Ils migrent aussi vers les tissus non-lymphoïdes pour donner les DC CD103+ de la lamina propria (IpDC). Dans des conditions normales, les monocytes Ly-6C- vont contribuer au développement des macrophages alvéolaires et les monocytes Ly-6C+ vont devenir des IpDC CX3CR1+ dans les tissus non-lymphoïdes. En cas d'inflammation, les monocytes Ly-6C+ donnent des DC dérivées des monocytes, comme les TipDC, des macrophages inflammatoires et pourraient également contribuer aux cellules myéloïde suppressives associées aux tumeurs. Les monocytes Ly-6C+ sont aussi suspectés d'induire des LC et la Microglie dans des conditions

expérimentales particulières. La contribution du LP à la génération des pDC et des cDC reste encore peu claire.

A l'origine de toutes les cellules du sang on trouve les **cellules souches hématopoïétiques (HSC)** présentes dans la **moelle osseuse (MO)** et douées de la capacité d'**auto-renouvellement**. Elles sont dites **multipotentes** en raison de leur pouvoir à générer toutes les lignées cellulaires du sang. Les DC sont issues d'un progéniteur commun à la lignée myéloïde (**CMP** ou **MP**) qui se différenciera en un nouveau progéniteur récemment décrit chez la souris et appelé **progéniteur des macrophages et des DC** (en anglais Macrophages-DC progenitor : **MDP**) qui pourra donner différentes populations de macrophages, des monocytes et les DC mais ne pourra pas se différencier en granulocytes, un autre type cellulaire myéloïde (Fogg et al., 2006) (Figure 8). Ce précurseur n'exprime pas les marqueurs spécifiques comme Ter119, CD11b, CD11c, Nkp46, CD3, CD19, GR1, CMH II, Sca1 et IL-7R $\alpha$ . Il est également caractérisé par l'expression de **CX<sub>3</sub>CR1**, **CD115** et **CD135**. Ce progéniteur va tout d'abord se différencier soit en **monocytes** soit en un **précurseur commun aux DC (CDP)**. Les CDP, toujours présentes dans la moelle osseuse, sont des cellules douées de prolifération qui pourront donner les **pDC** et le précurseur des cDC appelé **pre-cDC**. Les CDP n'ont plus la capacité à se différencier en monocytes (Liu et al., 2009). Les pre-cDC, au repos, sont retrouvées dans la moelle osseuse, le sang et la rate (Naik et al., 2006). Ces pre-cDC vont donner les différentes populations de cDC connues chez la souris, les **DC CD8+**, les **DC CD4+** et les **DC DN**. Un même pre-cDC peut donner les 3 populations de DC différentes mais l'expression hétérogène du CD24 sur ces cellules influence beaucoup leur devenir. En effet, les pre-cDC CD24<sup>high</sup> génèrent presque exclusivement les DC CD8+; les pre-cDC CD24<sup>low</sup> génèrent les DC CD8-. Les pre-cDC CD24<sup>int</sup> peuvent quant à elles générer aussi bien des DC CD8+ que CD8- (Naik et al., 2006). Il a été montré récemment que les pre-cDC pourront aussi coloniser la lamina propria et générer notamment des **DC CD103+** interstitielles (Varol et al., 2009).

D'autre part, les monocytes Gr1 (ou Ly-6C)+ pourront se différencier en **Tip-DC**, suite à une infection bactérienne, (Serbina et al., 2008) ou bien donner des **DC CX<sub>3</sub>CR1+** interstitielles de la lamina propria (Bogunovic et al., 2009).

Il a été montré récemment que les LC provenaient d'un **précurseur embryonnaire** qui colonise l'épiderme avant la naissance, se différencie et prolifère pendant les premières semaines de vie (Chorro et al., 2009). Il a aussi été montré que les **monocytes Gr1+** pouvaient migrer dans les tissus inflammés et se **différencier** en LC (Ginhoux et al., 2006).

Ce modèle est pour l'instant validé chez la souris. Il reste toutefois à transposer les connaissances acquises chez la souris à l'homme.

## **Le système immunitaire du rat**

L'homme, la souris et le rat sont trois espèces ayant divergé il y a plusieurs dizaines de millions d'années. Il n'est donc pas insensé d'imaginer des différences au sein du système immunitaire de ces trois espèces. Il n'existe toutefois pas d'étude exhaustive des différences dans leur système immunitaire. Il apparaît néanmoins que certains aspects de la réponse immunitaire du rat sont plus proches de celle de l'homme que de la souris.

Chez le rat, les molécules du CMH de classe I sont nommées RT1a et les molécules du CMH II sont nommées RT1B.

Chez le rat et l'homme, contrairement à la souris, les LT activés expriment les molécules du CMH de classe II (Reizis et al., 1994). De la même manière, le rat et l'homme expriment Fc $\epsilon$ RI et FcRaI sur différentes populations leucocytaires, ce qui n'est pas retrouvé chez la souris (Dombrowicz et Capron, 2001). La souris présente également un taux de molécules du complément faible dans la plupart de souches comparé aux autres mammifères dont le rat qui présente un niveau identique à l'homme (Ong et Mattes, 1989).

Certains aspects sont toutefois retrouvés chez le rat et la souris mais pas chez l'homme.

Les cellules endothéliales humaines expriment les molécules du CMH II (Choo et al., 1997). Elle sont également résistantes à l'apoptose médiée par Fas (Bouchet et al., 2002). Deux caractéristiques qui ne sont pas retrouvées chez le rat et la souris.

L'utilisation du rat en recherche thérapeutique est toutefois limitée par la difficulté plus importante d'obtenir des rats transgéniques contrairement aux souris qui présentent un éventail d'animaux transgéniques très large.

## II. LES CELLULES DENDRITIQUES PLASMACYTOÏDES

### Découverte des cellules dendritiques plasmacytoïdes

C'est en 1958 que les pathologistes **Lennert** et **Remmele** décrivent pour la première fois des cellules qui seront identifiées ultérieurement comme des pDC. Ils détectèrent la présence de cellules ayant une morphologie semblable aux **plasmocytes** dans les zones T des ganglions lymphatiques humains et dans la rate (LENNERT et REMMELE, 1958). Il fallut attendre quelques décennies et l'avancée technologique qui en découle pour permettre leur étude plus détaillée. Leur localisation dans les organes lymphoïdes, leur expression du CD4 et leur morphologie proche de celle des plasmocytes leur valut d'être baptisées "**Cellules T Plasmacytoïdes**" (Vollenweider et Lennert, 1983). Une étude a ensuite montré que ces cellules exprimaient des marqueurs spécifiques de la lignée monocytes-macrophages comme le **CD123** et le **CD36** ce qui leur valut d'être rebaptisées **monocytes plasmacytoïdes** (Facchetti et al., 1989). Il fallut attendre près de 10 ans pour que leur fonction soit associée à celles des cellules dendritiques (Grouard et al., 1997). En effet dans cette étude, les pDC extraites des amygdales humaines se différencient, en présence d'IL-3 et de CD40L, en DC in vitro et induisent la prolifération des cellules T CD4+ naïves.

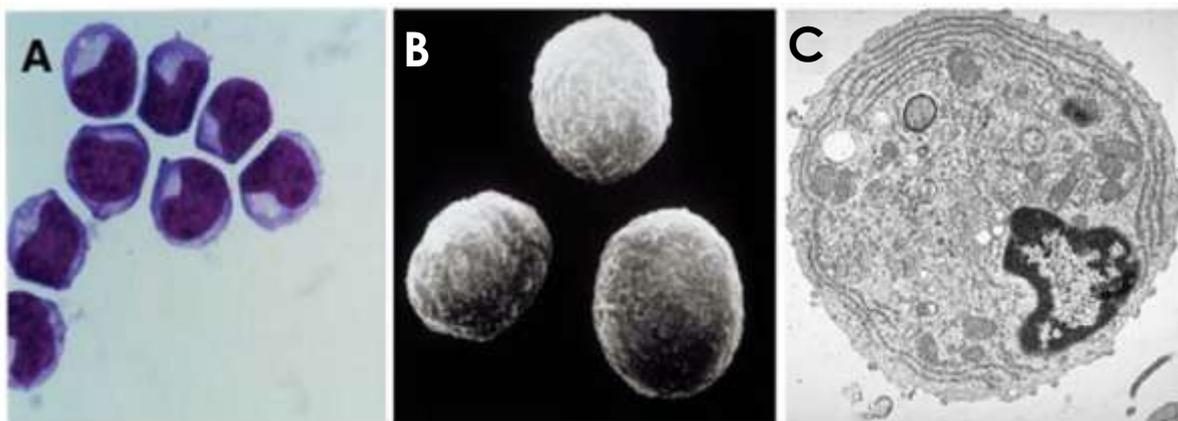
A la même époque, il a été montré que de l'**interféron (IFN) de type 1** était rapidement produit en réponse à une infection virale (Trinchieri et al., 1978). Il a d'abord été supposé que cet IFN était produit par des monocytes (Saksela et al., 1984). Plusieurs équipes ont ensuite étudié ces cellules productrices d'IFN révélant qu'elles produisaient la majorité de l'IFN produit en réponse à des virus, étaient **rares**, exprimaient le **CMH II** mais étaient distinctes des LT, LB, NK mais aussi des monocytes (Perussia et al., 1985; Fitzgerald-Bocarsly et al., 1988). Elles furent donc baptisées **cellules naturelles productrices d'IFN** (en anglais : Natural IFN-producing cells (**IPC**)) (Rönblom et al., 1983). Au cours des années, les IPC furent l'objet de nombreuses recherches qui ont permis de mettre en évidence, entre autre, leur réticulum endoplasmique très développé pour finalement les relier à la famille des DC (Ferbas et al., 1994).

C'est à la fin des années 90 que ces deux sujets scientifiques se rejoignent. En 1999, il fut en effet découvert que les cellules productrices d'interféron et les cellules T

plasmacytoïdes étaient la même population cellulaire (Grouard et al., 1997). Ces cellules étaient donc des cellules présentatrices d'Ag exprimant les molécules du CMH II, avec une morphologie dendritique et capables de stimuler des LT naïfs. Ces cellules furent donc officiellement baptisées **cellules dendritiques plasmacytoïdes** (pDC).

## Phénotype des pDC

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes, ou pDC, doivent leur nom à leur morphologie ressemblant à celle des plasmocytes à l'état immature. Elles présentent en effet une surface **lisse** et une forme légèrement **ovale** (Figure 9B). Elles sont légèrement plus petites que des monocytes mais plus grandes que des LT naïfs. Leur noyau en forme de haricot est excentré (Figure 9A), leur RE est très développé et elles présentent de nombreuses mitochondries (Figure 9C).



**Figure 9 - Morphologie des pDC.** (A) Coloration au Giemsa X400 de pDC humaines immatures; (B) Observation en microscopie électronique à balayage X3000 de pDC humaines immatures; (C) Observation en microscopie électronique à transmission X7000 de pDC humaines immatures. D'après Liu, Annu Rev Immunol, 2005.

Les pDC humaines ont tout d'abord été identifiées par leur expression du **CD4**, du **CD123** et de leur absence d'expression des molécules spécifiques des lignées T (CD3), B (CD19) et monocytaires (CD14) et du **CD11c**, un marqueur commun aux DC. On sait maintenant que les pDC humaines ont des marqueurs spécifiques comme le **BDCA-2** et **BDCA-4**. BDCA-2 est une lectine de type C transmembranaire qui intervient dans l'internalisation de l'Ag et sa présentation aux LT (Dzionek et al., 2001a). BDCA-4, aussi appelé **neuropiline-1**, est un récepteur aux sémaphorines de classe 3. Les sémaphorines jouent un rôle central dans la guidance et la régénération axonale (Nasarre et al., 2005). Exprimé par les cellules endothéliales et tumorales il joue le rôle de récepteur au VEGF-A (Dzionek et al., 2002). Les

pDC humaines expriment également l'**ILT-7** (Cao et al., 2006), **CD45RA**, les molécules du **CMH II**, **BCL11A<sub>XL</sub>**, un facteur de transcription à doigt de zinc (Pulford et al., 2006), ainsi que la protéine adaptatrice **CD2AP** (Marafioti et al., 2008), impliquée dans les réarrangements du cytosquelette d'actine (Gaidos et al., 2007) et également dans la localisation membranaire des récepteurs dans la zone de contact cellulaire sur les LT (Dustin et al., 1998) (Tableau 7).

Chez la souris, les pDC ont été identifiées en 2001 par trois groupes différents (Asselin-Paturel et al., 2001b; Nakano et al., 2001; Björck, 2001). Comme chez l'homme, les pDC murines expriment le CD4 et le CMH II et expriment spécifiquement **Siglec-H** (Zhang et al., 2006) et **BST-2** (CD317/téthérine) (Cao et al., 2009), reconnu par **mPDCA-1** (mouse PDC antigen 1), **Ly6-C** (Asselin-Paturel et al., 2001b), **120G8** (Asselin-Paturel et al., 2003), **LAG-3**, **CD45R** et la **chaîne  $\alpha$  du CD8**. Les pDC murines, contrairement à leur équivalent humain, montrent une expression du **CD11c**, mais à un niveau faible. Elles n'expriment pas les marqueurs liés au phénotype myéloïde **CD14** et **CD11b** (Asselin-Paturel et al., 2001a) (Tableau 7).

Chez le rat, les pDC ont un phénotype **CD11c- CD11b- CD103- CD4<sup>high</sup> CD45R+ CMH II+** (Hubert et al., 2004) (Tableau 7).

**Tableau 7 - Phénotype des pDC.** -,  $\pm$ , +, ++ et +++ indiquent l'expression relative de la protéine de chaque marqueur. ND signifie Non Déterminé.

	Homme	Souris	Rat
<b>CD4</b>	++	+	+++
<b>CD8</b>	-	$\pm$	-
<b>CD11b</b>	-	-	-
<b>CD11c</b>	-	$\pm$	-
<b>CD14</b>	-	-	ND
<b>CD45R</b>	ND	+	+
<b>CD45RA</b>	++	ND	ND
<b>CD123</b>	+++	-	ND
<b>BDCA-2</b>	+	ND	ND
<b>BDCA-4</b>	+	ND	ND
<b>CMH II</b>	++	+	+
<b>Ly6-C</b>	ND	++	ND
<b>BST2</b>	ND	++	ND
<b>SiglecH</b>	ND	+	+
<b>BCL11A<sub>XL</sub></b>	++	+ (mRNA)	ND
<b>CD2AP</b>	+	ND	ND

D'après Liu, Annu Rev Immunol, 2005; Hubert, J Immunol, 2004

## Développement des pDC

L'origine des pDC était assez controversée. En effet, certains arguments leur conféraient une origine lymphoïde, plutôt que myéloïde, et donc une origine distincte des cDC.

Le premier argument allant dans ce sens concerne SpiB qui est un facteur de transcription exclusivement restreint aux cellules lymphoïdes. SpiB est indispensable à la différenciation des précurseurs hématopoïétiques en pDC comme le montre une déficience en ce gène qui aboutit à une absence de pDC chez l'homme avec toutefois une différenciation normale des cDC (Schotte et al., 2004).

Un argument confortant cette hypothèse concerne Id2 et Id3, des inhibiteurs de différenciation. Ces inhibiteurs bloquent la génération de pDC, LB et LT à partir des progéniteurs hématopoïétiques, mais ne bloquent pas la différenciation des cellules myéloïdes et des NK (Spits et al., 2000). Ceci allant dans le sens d'une origine commune aux pDC, LB et LT différente de celle des cellules myéloïdes.

Des arguments encore plus convaincants existent également. En effet, les pDC humaines expriment le transcrite pour le pré-TCR $\alpha$ , marqueur des LT, et le transcrite pour  $\lambda$ 5, exprimé par les LB (Corcoran et al., 2003). De la même manière, les pDC effectuent des **réarrangements D-J** des chaînes lourdes des Ig (Shigematsu et al., 2004b), réarrangements qui n'ont pas lieu dans les cDC.

Tous ces arguments permettaient de supposer que les pDC avaient une origine lymphoïde. Or de nouveaux arguments vinrent contredire cette hypothèse. En effet, des résultats ont prouvé que les pDC pouvaient se différencier aussi bien à partir du **progéniteur commun à la lignée lymphoïde (CLP)** que du **progéniteur commun à la lignée myéloïde (CMP)** (Chicha et al., 2004; Onai et al., 2007). Tout comme un CMP ou un CLP murin peut se différencier aussi bien en pDC qu'en DC CD8<sup>+</sup> et DC CD8<sup>-</sup> (Naik et al., 2007). Le **ligand de Flt-3** (Flt-3L), induit l'activation du facteur de transcription **STAT3**, facteur essentiel au développement des pDC (Gilliet et al., 2002) mais également impliqué dans le développement des cDC. Ces résultats suggèrent donc l'existence d'un progéniteur commun aux cDC et aux pDC.

De récents résultats ont permis d'identifier un facteur de transcription restreint et essentiel aux pDC : **E2-2**. Il régule la synthèse d'autres facteurs comme SpiB et régule également

l'expression de gènes codant des marqueurs spécifiques des pDC comme BDCA-2 et ILT-7. E2-2 régule aussi l'expression de gènes contrôlant la production d'IFN (**IRF7**) (Cisse et al., 2008a).

Un autre facteur de transcription est indispensable pour la différenciation complète des précurseurs hématopoïétiques en pDC. Il s'agit d'**Ikaros** (Ik). C'est une protéine à doigt de zinc essentielle pour le développement de nombreux lignages hématopoïétiques (Georgopoulos et al., 1994). Des souris portant une mutation dans le gène Ikaros (insertion du gène de la  $\beta$ -Galactosidase en 5' de l'exon 3 (Kirstetter et al., 2002)) n'expriment qu'une très faible quantité de la protéine Ikaros. Ces souris ne possèdent aucune pDC en périphérie (Allman et al., 2006). Elles présentent toutefois des pDC dans leur moelle osseuse mais bloquées dans leur différenciation. En effet, elles n'expriment pas le CD45R ni le Ly49Q. Mais surtout, leur production d'IFN $\alpha$  en réponse à un virus est sévèrement réduite. Ceci indique que ces pDC ne sont pas fonctionnelles.

Tous ces résultats suggèrent donc qu'il existe bien un **progéniteur commun aux DC** (CDP) qui en se différenciant amorce une voie de différenciation bien spécifique aux pDC parallèlement à celle des cDC (Figure 8, p40).

## **Localisation des pDC dans l'organisme et migration**

Après leur développement dans la moelle osseuse, les pDC sont libérées de manière continue via le sang. Alors que les cDC résident dans les tissus périphériques et migrent ensuite vers les zones T des organes lymphoïdes secondaires (OLS) via les vaisseaux lymphatiques, les pDC ont, elles, une localisation différente. En effet, elles migrent directement vers les zones T des OLS au repos en traversant les **veinules post-capillaires à endothélium épais (HEV)**. Diverses chimiokines sont responsables de cette migration. Les pDC, expriment constitutivement la **L-Sélectine (CD62L)** et le **CCR7** qui sont attirés respectivement par **CCL19** et **CCL21**. Ces ligands sont produits par les HEV et les cellules stromales de la zone T des OLS qui vont donc attirer les pDC (Yoneyama et al., 2004; Penna et al., 2002). Les pDC sont des cellules rares et difficilement détectables dans les tissus périphériques comme la peau, les muqueuses ou les poumons dans des conditions normales. Elles sont en revanche, plus nombreuses par exemple dans les poumons de souris infectées par l'Influenza ou le RSV (GeurtsvanKessel et Lambrecht, 2008), dans les muqueuses vaginales de souris infectées par le virus herpes simplex (Lund et al., 2006) et dans la peau de patients infectés par le virus de

la varicelle, le papillomavirus et l'herpes simplex. Les pDC sont également recrutées dans un contexte inflammatoire ou autoimmun comme dans les lésions de la peau de psoriasis (Nestle et al., 2005), de lupus érythémateux (Farkas et al., 2001) et de lichen plan (de Vries et al., 2007), ainsi que dans la synovie inflammée dans le cas d'arthrite rhumatoïde (Cavanagh et al., 2005), dans les glandes salivaires de patients atteints du syndrome de Goujerot-Sjogren (Gottenberg et al., 2006) et dans les muscles inflammés au cours de la dermatomyosite (López de Padilla et al., 2007). Les pDC sont également recrutées dans les lésions cérébrales de patients atteints de sclérose en plaques (Lande et al., 2008).

Comment les pDC migrent-elles vers les tissus non-lymphoïdes? La réponse exacte à cette interrogation reste encore floue. Il est toutefois connu que les pDC expriment le **chemokine-like receptor 1 (CMKLR1)** responsable de la migration des pDC via son ligand la **chémérine** (Zabel et al., 2005). La chémérine est produite de manière constitutive sous forme inactive par les **cellules endothéliales et les fibroblastes**. Son clivage par une protéase à sérine dans les **tissus endommagés** la rend active. Ceci expliquerait le **recrutement précoce** des pDC dans les tissus endommagés. La production de chémérine apparaît plus importante dans les lésions cutanées de psoriasis, de lupus érythémateux et de lichen plan (Albanesi et al., 2009; Vermi et al., 2005; Parolini et al., 2007) corrélant avec la présence, dans ces lésions, d'un plus grand nombre de pDC.

Mais la chémérine n'est pas la seule à pouvoir attirer les pDC dans les tissus endommagés. En effet, l'**adénosine** et les **anaphylatoxines C3a** et **C5a** permettent aussi le recrutement des pDC dans les tissus endommagés (Schnurr et al., 2004; Gutzmer et al., 2006).

Les pDC migrent également en réponse à des chimiokines inflammatoires sécrétées lors de l'inflammation d'un tissu et dont elles expriment les récepteurs comme : **CXCR3** (récepteur de CXCL9 (Mig), CXCL10 (IP-10) et CXCL11 (ITAC)) et **CXCR4** (récepteur de CXCL12 (SDF-1)). Les pDC ne migrent pas en réponse aux ligands du CXCR3 seul qui n'est pas fonctionnel. En effet cela requiert la liaison du CXCR4 avec son ligand CXCL12. Cette liaison va activer le CXCR3 et permettre ainsi la migration des pDC en réponse aux chimiokines produites (Vanbervliet et al., 2003). Par ailleurs, la présence d'IFN de type 1 augmente la production des ligands de CXCR3, suggérant une boucle autocrine de recrutement des pDC. Les pDC seraient donc recrutées sur le site de l'inflammation par les ligands de CXCR3 et -4, produiraient de l'IFN de type 1, ce qui augmenterait la production des ligands du CXCR3 entraînant à leur tour un recrutement amplifié des pDC au niveau de l'inflammation. Les

ligands de CXCR3 et -4 semblent aussi induire l'accumulation des pDC et la formation de clusters dans les ganglions inflammés (Vanbervliet et al., 2003).

Mais les pDC pourraient également être présentes dans les tissus sains. L'équipe de Wendland et al a suggéré leur migration naturelle vers la muqueuse intestinale où elles migreraient grâce à leur récepteur à chimiokine **CCR9**, et ceci, aussi bien au repos qu'en situation inflammatoire. Cette équipe a également suggéré leur présence dans les reins (Woltman et al., 2007) . La même équipe a montré que les pDC pouvaient également assurer le recrutement des DC de la lamina propria (Wendland et al., 2007).

## Les pDC dans l'immunité innée

Les pDC jouent un rôle important dans le contrôle de l'infection virale en produisant de **grandes quantités d'IFN de type 1**. Cet IFN de type 1 induit immédiatement une réponse antivirale et assure aussi l'induction d'une réponse immune adaptative.

### Des acides nucléiques à la production d'IFN de type 1

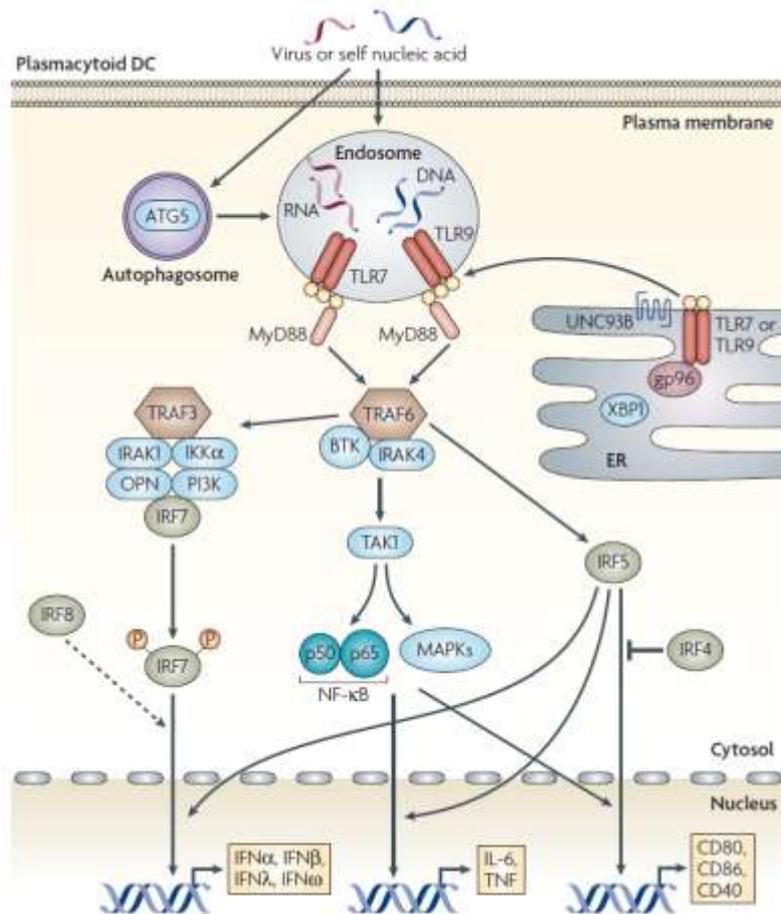
Les pDC présentent une spécificité de réponse vis-à-vis des infections virales. En effet, elles expriment les TLR 7 et 9, localisés dans des endosomes. Le TLR7 est spécifique des **ARN simples brins (ARNsb)** riches en uridine et guanosine, des **imidazoquinolines** synthétiques et des **analogues de la guanosine** (Diebold et al., 2004). Les pDC répondent ainsi aux infections par des virus à ARNsb comme le virus **influenza**, le **virus de la stomatite vésiculaire (VSV)**, le **RSV** et le **virus Sendai**. Le TLR9 est spécifique des ADNdb naturels avec un squelette phosphodiester ou bien de motifs synthétiques oligonucléotidiques avec un **motif CpG non-méthylé** (CpG ODN) (Hemmi et al., 2000; Haas et al., 2008). Les pDC peuvent ainsi répondre aux infections par des **virus à ADN double brin (ADNdb)** comme le **virus herpes simplex (HSV)** et le **cytomégalovirus murin (CMV)** (Krug et al., 2004b, 2004a).

Cette expression spécifique des TLR7 et 9 confère aux pDC une capacité de reconnaissance et de détection d'un grand nombre de virus. Ces virus sont la plupart du temps reconnus lors de l'endocytose des virions. Mais certains virus ne sont détectés que par l'autophagie de certains composants de leur répliquons, comme c'est par exemple le cas pour le VSV (Lee et al., 2007).

La reconnaissance par les TLR de leur ligand induit une cascade d'activation induite par le recrutement de la protéine adaptatrice **MyD88** (Myeloid differentiation primary-response

gene 88) qui est présente au niveau de tous les TLR excepté le TLR3. Cette cascade d'activation aboutit à l'association du facteur régulateur de l'IFN 7 (**IRF7**) avec diverses protéines qui, après phosphorylation et ubiquitinylation, migreront dans le noyau. Une fois localisées dans le noyau, ces protéines initieront la transcription des gènes codant les **IFN de type 1 (IFN $\alpha$ , - $\beta$ , - $\lambda$ , - $\omega$ )** (Honda et al., 2004; Taniguchi et Takaoka, 2002) (Figure 10).

L'induction rapide d'une réponse IFN de type 1 est en partie due à la présence constitutive et importante d'un taux élevé d'IRF7. De plus, l'activation continue de cet IRF7 est potentialisée par une rétention assez longue des ADN viraux dans les endosomes précoces (Honda et al., 2005). Les mécanismes de cette rétention prolongée restent toutefois encore inconnus. La traduction d'IRF7 est régulée par un **répresseur de traduction, 4E-BP**. Ce répresseur de traduction est faiblement exprimé chez les pDC, expliquant également l'expression constitutive d'IRF7 par les pDC (Colina et al., 2008). D'autres facteurs régulateurs de l'IFN interviennent. **IRF8** par exemple, amplifie la réponse induite par l'IRF7 (Tailor et al., 2007). **IRF5** intervient également dans cette voie avec en plus un rôle sur la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'**IL-6** et le **TNF**. IRF4, quant à lui, est fortement exprimé par les pDC et régule négativement la production de ces cytokines en entrant en compétition avec IRF5 pour se fixer à MyD88 (Negishi et al., 2005).



**Figure 10 - Voies de signalisation induites par les acides nucléiques dans les pDC.** D'après Gilliet, Nat Rev Immunol, 2008. Les pDC immatures expriment préférentiellement les TLR7 et 9. Ces TLR sont délocalisés vers des endosomes en présence d'acides nucléiques ou de virus. La reconnaissance de leur ligand induit l'activation de MyD88 et entraîne une cascade d'évènements aboutissant à la transcription des gènes d'IFN. Cette cascade entraîne ensuite la transcription des gènes de cytokines pro-inflammatoires et de molécules de co-stimulation.

## Rôle de l'IFN de type 1 dans l'immunité innée

L'IFN de type 1 est une famille de glycoprotéines composée des IFN $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\omega$ ,  $\pi$ . Les IFN de type 1 sont produits par de nombreux types cellulaires comme les LB, LT, cellules NK, macrophages, fibroblastes, ostéoblastes et autres.

### a. IFN et virus

L'IFN de type 1 a un **rôle antiviral** direct. En effet, il bloque différentes étapes du cycle de vie du virus par l'expression des différents gènes qu'il induit. Les protéines Mx par exemple sont des GTPases induites par l'IFN $\alpha$  qui bloquent le transport des virus encapsidés et la réplication de leur génome (Haller et Kochs, 2002). Les protéines kinases R dépendantes d'ARN (PKR) inhibent la traduction de l'ARN viral et induisent l'apoptose de la cellule infectée. L'IFN induit

bien d'autres gènes ayant une activité antivirale comme ADAR1, une déaminase de l'ARN viral qui change les adénosines en inosines (Grandvaux et al., 2002).

### **b. IFN et cellules NK**

Très tôt il a été émis l'hypothèse de l'existence d'une population de cellules accessoires produisant de l'IFN $\alpha$  et qui serait responsable de la lyse par les NK des cellules infectées par un virus (Bandyopadhyay et al., 1986; Oh et al., 1987). Il fallut attendre près de deux décennies pour déterminer qu'il s'agissait des pDC. En effet, il a été montré que les pDC contribuaient à activer les NK en réponse à un virus via la production d'IFN $\alpha$  (Gerosa et al., 2005). Cette production d'IFN $\alpha$  favorise leur **activité cytolytique** et potentialise ainsi une **élimination précoce** du virus. Les pDC assurent également le recrutement des NK, ainsi que des LT, via leur production de chimiokines (Megjugorac et al., 2004). Ce recrutement peut se faire aussi bien dans les ganglions lymphatiques que sur le site de l'infection.

### **c. IFN et DC**

L'IFN produit par les pDC agit en premier lieu de manière autocrine en améliorant la survie des pDC en culture in-vitro. Ce phénomène est dû soit à la présence directe d'IFN $\alpha$ , soit à la présence de ligands des TLR7 et 9 qui induiront la production d'IFN $\alpha$ . De plus, la production d'IFN $\alpha$  est elle-même augmentée par l'IFN $\alpha$  produit qui entraîne la surexpression d'IRF7, installant ainsi une boucle autocrine de production d'IFN.

L'IFN $\alpha$  agit également sur les cDC en induisant leur maturation. Les DC CD11c+ ainsi maturées pourront induire la différenciation de Treg producteurs d'IL-10 (Ito et al., 2001).

L'IFN $\alpha$  produit par les pDC peut, en présence de GM-CSF, induire la différenciation de monocytes en cDC exprimant le TLR7 ainsi que les molécules du CMH II. EN réponse à un ligand de TLR7, ces DC dérivées de monocytes entraînent l'activation des LT CD8+ (Mohty et al., 2003). L'IFN $\alpha$  a un rôle important sur les cDC. Il les rend notamment plus aptes à cross-présenter des Ag aux LT CD8+ (Le Bon et al., 2003), augmentant en même temps la survie de ces T CD8+ et leur prolifération (Tough et al., 1996) ainsi que la polarisation des réponses LT CD4+ en réponses Th1 (Hibbert et al., 2003).

#### d. Régulation de la réponse IFN de type 1

L'IFN de type 1 jouant un rôle très important dans l'activation de nombreuses cellules du système immunitaire, sa production doit rester sous contrôle constant. En effet, une production aberrante pourrait entraîner une réponse immunitaire inadaptée et donc nuire à l'hôte. Ce contrôle se fait via différents récepteurs. C'est par exemple le cas pour l'interaction entre BDCA-2 ou ILT-7 à la surface des pDC et la chaîne  $\gamma$  des récepteurs Fc aux IgE (**Fc $\epsilon$ RI**). En réponse à un ligand de TLR, cette association active les pDC mais bloque totalement leur capacité à produire de l'IFN de type 1 (Cao et al., 2006; Dzionek et al., 2001b).

La production d'IFN de type 1 par les pDC chez la souris peut être contrôlée par l'utilisation d'un Ac anti-SigleCH. En effet, le pontage entre deux protéines SigleCH par cet Ac réduit considérablement les capacités de la pDC à produire de l'IFN (Blasius et al., 2006).

#### Le rôle cytotoxique des pDC

Les monocytes, les cellules NK et les LT CD4+ peuvent exprimer **TRAIL** (TNF-related apoptosis-inducing ligand) à leur surface en réponse à la production d'IFN $\alpha$  par les pDC (Herbeuval et al., 2005)(Sato et al., 2001)(Kayagaki et al., 1999). Cette expression se traduit par l'élimination des cellules infectées ou tumorales. TRAIL est un membre de la superfamille du TNF qui est connu pour induire l'apoptose des cellules cancéreuses ou tumorales via des récepteurs de mort (DR4 et DR5).

Les pDC ont également été décrites comme pouvant exprimer TRAIL. En effet, cette expression a été décrite après que les pDC aient été en contact avec le virus de l'influenza, de l'immunodéficience humaine (HIV), par le virus de la leucémie humaine à cellule T 1 (HTLV-1) ou bien encore après reconnaissance de ligands de TLR7 et 9. Les pDC possèdent alors une activité cytotoxique et peuvent induire l'apoptose de cellules cibles (Chaperot et al., 2006a; Hardy et al., 2007). Elles sont alors appelées **cellules dendritiques plasmacytoïdes productrices d'IFN $\alpha$  tueuses (IKpDC)**. De manière intéressante, des études ont montré que l'expression de TRAIL par les pDC était très rapide et s'expliquait non pas par une néo-synthèse de TRAIL comme pour l'IFN de type 1, mais par le recrutement des grandes quantités de TRAIL déjà présentes dans le cytoplasme et relocalisée à la membrane (Colisson et al., 2010).

TRAIL n'est pas la seule protéine exprimée par les pDC leur attribuant un rôle cytotoxique. En effet, les pDC produisent du granzyme B qui est connu pour induire l'apoptose des cellules ciblées. Cette production de granzyme B est augmentée en présence d'IL-3 et -10 ou encore par stimulation par des allergènes (Bratke et al., 2010) mais est inhibée en présence d'un ligand des TLR7 et -9.

## Les pDC dans l'immunité adaptative

De très nombreux exemples dans la littérature décrivent les cDC comme de bien meilleures CPA comparativement aux pDC. En effet, elles ont un plus fort pouvoir d'endocytose et expriment plus fortement les molécules du CMH II à leur surface. Différentes études montrent toutefois que les pDC peuvent présenter les Ag aux LT CD4+ ainsi qu'aux LT CD8+. Après reconnaissance de ligands des TLR7 et 9, les pDC produisent de grandes quantités d'IFN $\alpha$ . Cet IFN suffit à induire un profil de différenciation des LT CD4+ vers un profil Th1 (Kadowaki et al., 2000). En effet, l'IFN $\alpha$  seul in-vitro suffit pour induire un profil Th1 (Brinkmann et al., 1993).

### IFN et immunité adaptative

L'IFN $\alpha$  joue un rôle important dans l'immunité adaptative. Tout simplement car il est capable seul d'induire une différenciation Th1. Des pDC ayant reçu un stimuli ou des conditions de culture ne leur faisant pas produire de l'IFN $\alpha$  (IL-3 et CD40L) induisent, quant à elles, une différenciation des LT CD4 en LT Th2 (Grouard et al., 1997).

L'IFN $\alpha$  produit par les pDC intervient aussi dans l'immunité humorale. Il a été en effet montré que les pDC, après stimulation par un virus, pouvaient induire la différenciation des LB spécifiques du virus en plasmocytes sécrétant d'Ac. Dans ce cas, l'IFN $\alpha$  agit en synergie avec l'IL-6 que les pDC produisent également. L'IFN $\alpha$  est responsable de leur différenciation en **plasmablastes** ne sécrétant pas d'Ig et l'IL-6 complète leur différenciation en **plasmocytes** sécrétant des Ac (Jego et al., 2003).

Les pDC produisant de l'IFN $\alpha$  sont aussi impliquées dans l'établissement et le maintien d'une mémoire immunologique via des **LT mémoires** (Rothenfusser et al., 2004).

## Capture et présentation antigénique

La capacité de présentation antigénique par les pDC des peptides endogènes est indéniable, que ces peptides endogènes soient exprimés constitutivement ou dérivés de virus les ayant infectés (Fonteneau et al., 2003). Cette capacité de présentation antigénique des peptides exogènes est toutefois plus faible comparée à celle des cDC. Ceci pouvant être facilement expliqué par de nombreuses études montrant que les pDC n'ont pas la capacité de **phagocytose** et de **macropinocytose** (Grouard et al., 1997). Cette affirmation reste toutefois controversée. Certaines études plus récentes ont montré que les pDC ont la capacité de phagocyter des **cellules apoptotiques** (Hoeffel et al., 2007) alors que d'autres, au contraire, ont montré qu'elles ne pouvaient pas (Dalgaard et al., 2005). Il en va de même pour des **billes de latex** ou des **bactéries extracellulaires** (Piccioli et al., 2009; Stent et al., 2002). Elles ont en revanche la capacité non-controversée d'internaliser des Ag solubles opsonisés, c'est-à-dire recouverts d'Ac, via leurs récepteurs **FcγRIIIa** (Benitez-Ribas et al., 2006). Il a toutefois été montré très récemment que les pDC pouvaient phagocyter des Ag encapsulés dans des microparticules de poly(acide lactique-coglycolique) et les apprêter. De manière surprenante, si des ligands de TLR sont placés dans ces microparticules, les pDC les reconnaissent, mûrent et produisent de l'IFNα (Tel et al., 2010).

Un élément pouvant également expliquer la faible présentation antigénique des pDC sur les molécules du CMH II est que ces molécules du CMH II ne restent pas longtemps à la surface de la pDC (LeibundGut-Landmann et al., 2004). Ceci est dû à un renouvellement constant du CMH II à la surface des pDC. En effet, l'expression du principal facteur de transcription de la machinerie de présentation CMH II, CIITA, n'est pas inhibée dans les pDC activées. Il y a donc synthèse constante de nouvelles molécules de CMH II et renouvellement de celles présentes en surface. Ajoutant à cela une absence d'inhibition de l'ubiquitinylation des molécules du CMH II dans les pDC activées. Ceci empêche une présentation prolongée des complexes CMH II-peptides à la surface des pDC.

Les pDC ont longtemps été décrites comme incapable d'effectuer la présentation croisée des Ag exogènes sur les molécules du CMH I (Salio et al., 2004; Sapoznikov et al., 2007). Ce dogme est pourtant remis en cause par différentes études qui prouvent le contraire. Les pDC peuvent en effet, in vitro, présenter des peptides du VIH sur les molécules du CMH I à des LT CD8<sup>+</sup> (Hoeffel et al., 2007). La prise en charge des Ag par les pDC se fait

par le marqueur de surface BDCA-2. Cette capacité a également été décrite chez la souris chez des pDC après stimulation par un ligand de TLR 7 ou 9 (Mouriès et al., 2008).

Cette présentation croisée peut aussi se faire par chargement direct des peptides viraux dans les endosomes précoces (Di Pucchio et al., 2008).

### **Différenciation et maturation des pDC**

Quand les pDC reçoivent un signal d'activation adapté elles produisent de grandes quantités d'IFN de type 1. Elles vont ensuite maturer pour acquérir leur **morphologie dendritique** (Figure 11) et jouer leur rôle de CPA. Ces deux états distincts ont été, et sont toujours, sujets à controverse quant à la terminologie utilisée pour désigner ces cellules. En effet, les pDC au repos ont une forme plasmacytoïde mais n'ont pas de dendrites. Ensuite, quand elles sont activées et produisent de grandes quantités d'IFN de type 1, elles ont toujours leur forme plasmacytoïde. Il a donc été proposé de nommer ces cellules des **cellules plasmacytoïdes pré-dendritiques** ou **cellules productrices d'IFN de type 1 professionnelles**. Les pDC acquièrent enfin leur morphologie dendritique, présentent des Ag à leur surface et perdent leur morphologie plasmacytoïde ainsi que leur capacité à produire de grandes quantités d'IFN de type 1. Il avait donc été proposé de baptiser cet état des pDC : **Cellule dendritique dérivé des pDC** ou **cellule dendritique dérivée plasmacytoïde** (Soumelis et Liu, 2006). Néanmoins cette nomenclature n'a pas été adoptée très largement et des confusions peuvent persister dans la littérature. Pour ma part j'utiliserai le terme de **pDC** pour ces trois états en précisant si elles sont au repos, productrices d'IFN de type 1 (avec une morphologie plasmacytoïde) ou bien matures et présentatrices d'Ag (avec une morphologie dendritique).

La maturation des pDC peut être induite par différents stimuli comme l'IL-3, des virus, des bactéries ou encore des motifs CpG ODN.

La maturation des pDC s'accompagne d'une transformation morphologique **radicale**. D'une cellule lisse et ronde, les pDC deviennent des cellules avec une morphologie dendritique.



**Figure 11 - Morphologie des pDC avant et après maturation.** Observation de pDC en microscopie électronique à transmission X3000 au repos (A) et après maturation en présence d'IL-3 et de CD40L (B). D'après Colonna, Nat Immunol, 2004.

Cette morphologie est liée à leur fonction de stimulation des lymphocytes T. En effet, leurs **nombreuses dendrites** augmentent considérablement leur **surface de contact** avec les LT naïfs.

Les transformations induites par la maturation ne sont pas que morphologiques mais également fonctionnelles. Les pDC vont surexprimer les molécules du CMH II et de co-stimulation (Liu, 2005). Elles ne vont alors plus pouvoir produire d'IFN de type 1 mais acquérir les fonctions des CPA en assurant la stimulation des LT spécifiques aussi bien naïfs (Fonteneau et al., 2004) qu'activés (Krug et al., 2003).

### **Vers des Lymphocytes Th**

Les pDC activées par des ligands de TLR7 et 9 ou par un virus entraînent la différenciation des T naïfs en **Th1** produisant de l'**IFN $\gamma$**  (Cella et al., 2000) et de l'**IL-10** (Kadowaki et al., 2000). Cette polarisation semble être dépendante de la production d'IFN $\alpha$  par les pDC. En effet, cultivées en présence d'IL-3 et de CD40L, les pDC mûrissent mais ne produisent pas de grandes quantités d'IFN $\alpha$ . Elles surexpriment en revanche la molécule de costimulation **OX40L** et entraînent la différenciation de T naïfs en **Th2** produisant de l'**IL-4, -5 et -10** (Ito et al., 2004).

### **Vers des Lymphocytes T régulateurs et tolérance**

Les pDC, classiquement activées par des ligands de TLR7 et 9, sont immunogènes. Cela semble être différent pour des pDC immatures ou stimulées de manière alternative. Il existe maintenant différentes études décrivant les pDC comme induisant une tolérance aux cellules

tumorales, aux Ag non-nocifs ou aux alloAg (Tableau 8). Les pDC ont donc également un rôle tolérogénique.

Les pDC sont attirées par les cellules tumorales malignes d'épithélia ovariens qui produisent du SDF-1. Sur ce site tumoral, les pDC vont induire l'activation de **Treg** producteurs d'IL-10, induisant ainsi une **tolérance** plutôt qu'une **réponse antitumorale** (Zou et al., 2001).

Les pDC induisent également une tolérance via des Treg, qui vont supprimer la prolifération des Teff par les cDC, en réponse à des **Ag inoffensifs inhalés** (de Heer et al., 2004). Dans cette étude, l'absence de pDC par déplétion induit le développement de **symptômes asthmatiques**. La déplétion de pDC par des Ac peut également lever la tolérance aux Ag alimentaires. Les pDC issues des ganglions mésentériques et du foie semblent être responsables de cette tolérance, alors que les pDC spléniques semblent au contraire ne pas avoir cette capacité (Goubier et al., 2008). On peut donc imaginer que les pDC ont des propriétés tolérogéniques différentes suivant leur localisation. Cette observation a été donc confirmée dans un modèle de greffe où la déplétion des pDC, ainsi que le blocage de leur localisation ganglionnaire, **inhibe** la génération de Treg et la **survie** du greffon (Ochando et al., 2006).

Les mécanismes par lesquels les pDC induisent la tolérance ont été largement étudiés. Chez la souris, dans les ganglions lymphatiques drainant la tumeur, une fraction de pDC exprime l'enzyme **indoleamine-2,3-dioxygénase (IDO)**, cette enzyme est responsable du catabolisme du tryptophane. Elle élimine ainsi le stock de tryptophane nécessaire aux LT pour la génération d'une réponse effectrice, induisant ainsi une tolérance. Cette expression d'IDO par les pDC a été observée après stimulation via le récepteur B7 (Mellor et al., 2003) ou via CD200R (Fallarino et al., 2004) mais également après stimulation en présence de ligands du TLR9. Après incubation en présence du VIH, les pDC humaines expriment également IDO, induisant ainsi la différenciation des T CD4+ naïfs en Treg (Manches et al., 2008) qui vont supprimer la prolifération des T CD4+ (Boasso et al., 2007).

IDO n'est pas la seule protéine jouant un rôle dans cette induction de tolérance. En effet, ICOS-L (inducible costimulator ligand) est surexprimé sur les pDC activées. Elles vont alors pouvoir induire des Treg producteurs d'IL-10 à partir de LT naïfs (Ito et al., 2007). Ce phénomène peut être potentialisé en présence d'IFN de type 1 produit par les pDC (Levings et al., 2001).

Mais les pDC activées ne sont pas les seules à avoir ces capacités d'induction de Treg. En effet, c'est aussi le cas pour les pDC immatures (Bilsborough et al., 2003), ce qui rappelle le

rôle des cDC immatures dans l'induction de tolérance. Les pDC immatures peuvent également induire l'anergie de clones T CD4+ et bloquer leur production d'IL-10 (Kuwana et al., 2001).

Les pDC, de phénotype immature, suppriment la réponse inflammatoire à des allergènes respiratoires (de Heer et al., 2004), améliorent la greffe de cellules souches allogéniques (Fugier-Vivier et al., 2005) et inhibent également la maladie du greffon contre l'hôte (Graft versus host disease : GVHD) (Hadeiba et al., 2008a) (Tableau 8).

**Tableau 8 - Propriétés tolérogéniques des pDC**

Modèle	Mécanisme	Conséquence	Références
Asthme	Treg	Inhibe la sensibilisation et les réponses Th2	(de Heer et al., 2004)
GVHD	Treg	Améliore la survie du greffon et réduit la production d'IL-17	(Hadeiba et al., 2008a)
Transplantation	Treg	Améliore la survie du greffon	(Ochando et al., 2006)
Tumeur (ovaire)	Treg produisant de l'IL-10	Réponse T antitumorale faible	(Zou et al., 2001)
Tumeur (mélanome)	Treg induit par IDO	Réponse T antitumorale faible	(Sharma et al., 2007a, 2009)
VIH	Treg induit par IDO	Altération des DC et les LT spécifiques du VIH	(Boasso et al., 2007; Manches et al., 2008)
Tolérance orale d'Ag alimentaire	Délétion/Anergie des LT	Inhibe les réponses d'hypersensibilité retardées médiées par les T CD8+	(Goubier et al., 2008)
in-vitro IL-3/CD40L ou ligand de TLR	Treg produisant de l'IL-10 via ICOS-L	Altération de la prolifération des LT	(Ito et al., 2007)
in-vitro IL-3 et IL-10	production de granzyme B	Altération de la prolifération des LT	(Jahrsdörfer et al., 2010)

## Rôle des pDC en pathologie

### Infections virales

Les pDC, exprimant les TLR7 et 9, présentent une spécificité de réponse vis-à-vis des infections virales. L'IFN $\alpha$  qu'elles produisent agit dès l'entrée du virus pour limiter sa propagation grâce à son fort pouvoir antiviral.

Le **virus respiratoire syncytial (RSV)** cause une infection des poumons et des voies respiratoires et est courant chez les jeunes enfants et les nourrissons. Lors d'une infection par ce virus, les pDC sont recrutées sur le site de l'infection, c'est-à-dire les poumons, où elles vont être activées et produire de grandes quantités d'IFN de type 1 (Boogaard et al., 2007). Elles vont ainsi pouvoir inhiber la réplication du virus, réduisant ainsi l'inflammation pulmonaire et

l'hyperréactivité des voies respiratoires (Wang et al., 2006). Dans certains cas, le virus pourrait développer des mécanismes d'échappement à cette réponse en bloquant la production d'IFN de type 1 par les pDC in vivo, bloquant ainsi la mise en place d'une réponse immune antivirale (Jewell et al., 2007).

Le **virus herpes simplex (HSV)** est un virus ubiquitaire et contagieux qui entraîne des éruptions cutanées. Ce virus n'infecte pas les pDC malgré le fait qu'elles expriment son récepteur. Elles induisent en revanche la prolifération des LT spécifiques après leur recrutement dans les lésions herpétiques. Elles assurent ainsi un contrôle de l'infection lors des infections récurrentes (Donaghy et al., 2009).

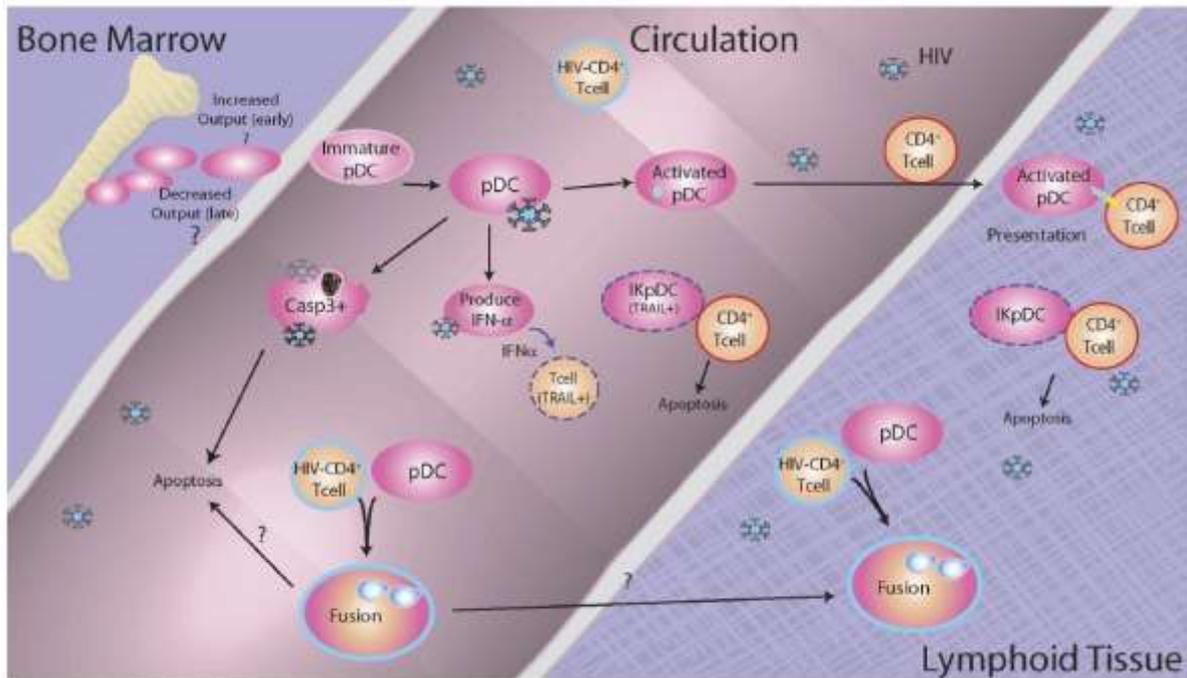
L'infection par le **virus influenza** est responsable de la grippe. Contrairement à ce que l'on pourrait penser, les pDC ne jouent pas un rôle primordial dans la défense contre ce pathogène. En effet, des études ont été réalisées utilisant des souris sauvages et des souris dont le gène Ikaros est muté,  $Ik^{L/L}$  (Kirstetter et al., 2002), souris n'ayant aucune pDC en périphérie (Allman et al., 2006). L'infection par le virus influenza A des deux souches montre une guérison identique des souris (Wolf et al., 2009). Les pDC ne sont donc pas nécessaires pour combattre ce virus. Les cDC sont suffisantes pour combattre le virus influenza. Une autre étude allant dans le même sens a, quant à elle, montré que la clairance du virus de l'influenza dans les poumons n'était pas due aux pDC mais aux DC langérine<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> (GeurtsvanKessel et al., 2008). De plus, dans le cas d'infection par des doses létales de virus influenza, une étude a montré chez la souris que les pDC, en absence de peptide du virus sur les molécules du CMH I, induisaient l'apoptose dépendante de FasL des LT CD8<sup>+</sup>, aggravant ainsi l'infection (Langlois et Legge, 2010).

Le plus grand nombre d'études des pDC dans le cas d'infection virale reste sûrement dans le cas du **virus de l'immunodéficience humaine (VIH)**. En effet, les pDC expriment les cibles directes d'infection par le VIH, à savoir CD4, CXCR4 et CCR5, qui sont les cibles utilisées par le virus pour infecter les LT. Le virus est néanmoins moins apte à infecter les pDC par rapport aux cDC. Ceci peut éventuellement s'expliquer par le rôle antiviral de l'IFN $\alpha$  que les pDC produisent en réponse au virus. Cet IFN $\alpha$  bloque également la réplication du virus à l'intérieur des LT, et ceci indépendamment de l'état de maturation des pDC. Une protéine inconnue de moins de 3kDa intervient également (Groot et al., 2006). A noter également que la quantité de pDC dans le sang périphérique de patients infectés par le VIH diminue considérablement dans les stades avancés de la maladie. Ceci est proportionnel à l'augmentation de la charge virale et corrèle avec l'apparition de maladies opportunistes

(Soumelis et al., 2001). De manière réciproque, les patients sous thérapie antirétrovirale hautement active (HAART) présentent une charge virale diminuée et une quantité de pDC importante. Un recrutement des pDC dans les ganglions lymphatiques pourrait expliquer la diminution de la quantité de pDC dans le sang périphérique. Mais ce recrutement a été décrit comme ayant lieu lors de la phase asymptomatique de la maladie et n'induit qu'une faible diminution du nombre de pDC en périphérie (Dillon et al., 2008). Cela n'apparaît donc pas comme l'explication la plus plausible. Cette diminution pourrait en revanche s'expliquer plus vraisemblablement par une apoptose plus importante des pDC (Meyers et al., 2007) ainsi que par une fusion des pDC avec les LT CD4<sup>+</sup> (Fitzgerald-Bocarsly et Jacobs, 2010) (Figure 12).

La présence du VIH induit l'expression de TRAIL sur les pDC, appelées ainsi des IKpDC qui vont pouvoir tuer les LT infectés par le VIH (Herbeuval et al., 2006). Chez les patients VIH, 50% des pDC circulantes ont été décrites comme exprimant TRAIL. Toutes ces pDC pourront ainsi détruire un grand nombre de LT infectés par le VIH mais également des LT portant des particules non-infectieuses du VIH. Ceci n'est pas que bénéfique. En effet, la migration de ces IKpDC dans les ganglions serait responsable de l'apoptose de LT CD4<sup>+</sup> non-infectés (Stary et al., 2009) (Figure 12).

Les pDC jouent donc un **rôle complexe** dans l'infection par le VIH en pouvant à la fois contrôler la propagation du virus et le détruire, mais pouvant également aggraver la maladie en détruisant les LT CD4<sup>+</sup>.



**Figure 12 - Rôle des pDC chez les patients infectés par le VIH.** D'après Fitzgerald-Bocarsly, J Leuko Bio, 2010. Les pDC entrent dans la circulation depuis la moelle osseuse. Elles migrent vers les tissus lymphoïdes ou circulent jusqu'à rencontrer un virus HIV-1 vivant ou défectueux, ou bien d'autres pathogènes. La rencontre avec le HIV-1 peut entraîner l'activation des pDC et la production d'IFN $\alpha$ , une maturation complète ou partielle des pDC, l'apoptose des pDC ou encore la fusion des pDC avec les LT CD4 $^{+}$  infectés par le HIV-1. Ceci peut entraîner la migration des pDC vers les ganglions lymphatiques et leur remplacement par des pDC immatures provenant de la MO. Les auteurs supposent que la formation de pDC dans la MO pourrait décliner au cours de l'infection dû à un épuisement de la réplication. De forts taux d'IFN $\alpha$  induisent l'expression de TRAIL par les pDC, les transformant en IKpDC. Cela induit aussi l'expression des molécules HLA-DR par les LT CD4 $^{+}$ . Ceci est supposé entraîner la mort et la déplétion des LT infectés et des LT ayant rencontré un virus défectueux, mais également la mort des pDC.

## Autoimmunité

Le fait que les TLR7 et 9 soient localisés dans des endosomes est un facteur important pour éviter les réactions autoimmunes vis-à-vis des acides nucléiques du soi. En effet, ces acides nucléiques du soi ne sont pas stables dans le milieu extracellulaire et sont rapidement dégradés. Ils ne peuvent ainsi pas accéder aux endosomes où sont localisés les TLR. Cela arrive pourtant dans certaines maladies autoimmunes où cette tolérance au soi est rompue. C'est par exemple le cas pour le **lupus érythémateux systémique** (SLE) et le **psoriasis** (Lande et al., 2007; Barrat et al., 2005).

Chez les patients atteints de SLE, les acides nucléiques du soi forment des complexes avec des **autoAc** dirigés contre les acides nucléiques et les protéines nucléaires. Ces complexes sont alors reconnus par les **récepteurs Fc $\gamma$ RII** à la surface des pDC et transportés vers les endosomes où ils vont être accessibles pour les TLR7 et -9 (Barrat et al., 2005). Cette

reconnaissance entraîne une activation continue des pDC et donc une production continue d'IFN de type 1. Cet IFN va alors induire la maturation et l'activation des cDC. Les cDC ainsi activées vont provoquer la prolifération des LT autoréactifs (Blanco et al., 2001). La reconnaissance des complexes d'acides nucléiques et d'autoAc par le TLR9 dans la SLE est favorisée par RAGE (receptor for advanced glycation end products). Cette protéine RAGE est reconnue par HMGB1, protéine liant l'ADN nucléaire relargué par les cellules apoptotiques, qui compose également les complexes acides nucléiques-autoAc (Tian et al., 2007).

Le **psoriasis** est une maladie autoimmune commune de la peau. Dans cette pathologie, un peptide antimicrobien cationique LL37 forme un complexe avec des ADN libres (Lande et al., 2007). Cette association rend l'ADN très résistant à la dégradation par des nucléases. Ainsi complexé, l'ADN va entrer dans la cellule et rejoindre les endosomes où il se fixera sur le TLR9, entraînant une forte production d'IFN de type 1. Dans les lésions psoriasiques, l'ADN complexé au LL37 assure une activation constante des pDC et une production continue d'IFN de type 1, entraînant une autoimmunité médiée par les LT autoréactifs (Nestle et al., 2005).

Le rôle des pDC dans l'autoimmunité ne se limite pas à ces deux maladies. En effet, l'implication des pDC a aussi été décrite, entre autre, dans le développement de l'encéphalite autoimmune expérimentale (EAE) (Isaksson et al., 2009).

## **Cancer**

Les pDC ne jouent pas forcément un rôle anti-tumoral vis-à-vis de tumeurs solides comme celles du cou, du sein, des ovaires, des poumons ou encore de la peau. En effet, les pDC y sont présentes dans un état non-activé et induisent un environnement immunosuppresseur autour de la tumeur, bloquant ainsi son contrôle et sa destruction.

Les pDC sont présentes en grand nombre dans les fluides ascitiques des femmes ayant un cancer ovarien à un stade avancé. Dans cet environnement, les pDC vont entraîner la génération de LT CD8<sup>+</sup> producteurs d'IL-10 qui, avec leurs fonctions suppressives, vont bloquer les fonctions des LT effecteurs spécifiques des Ag tumoraux (Wei et al., 2005).

Chez les patientes ayant un cancer du sein, les risques de dissémination de la tumeur et de rechute sont liés à une forte présence des pDC (Treilleux et al., 2004).

Comme je l'ai décrit dans la partie tolérance, des études montrent que les pDC présentes dans les ganglions drainant la tumeur exprimentIDO, activant directement les Treg et bloquant ainsi la mise en place d'une réponse T antitumorale (Sharma et al., 2007b).

L'absence de ligands de TLR dans le microenvironnement de la tumeur explique l'état inactivé des pDC infiltrant la tumeur. Cet état est aussi dû à différents facteurs produits par la tumeur elle-même comme de l'IL10, du TGF- $\beta$  et du VEGF- $\beta$ . Cet état peut tout de même être renversé et les pDC activées. C'est par exemple le cas lors de traitements antitumoraux à base d'acides nucléiques ou de motifs CpG qui vont entrer dans la cellule et parvenir dans les compartiments endosomaux. La reconnaissance de ces acides nucléiques par les TLR7 et 9 va induire l'activation de la pDC et la production d'IFN de type 1, permettant ainsi la levée de l'immunosuppression induite par les pDC.

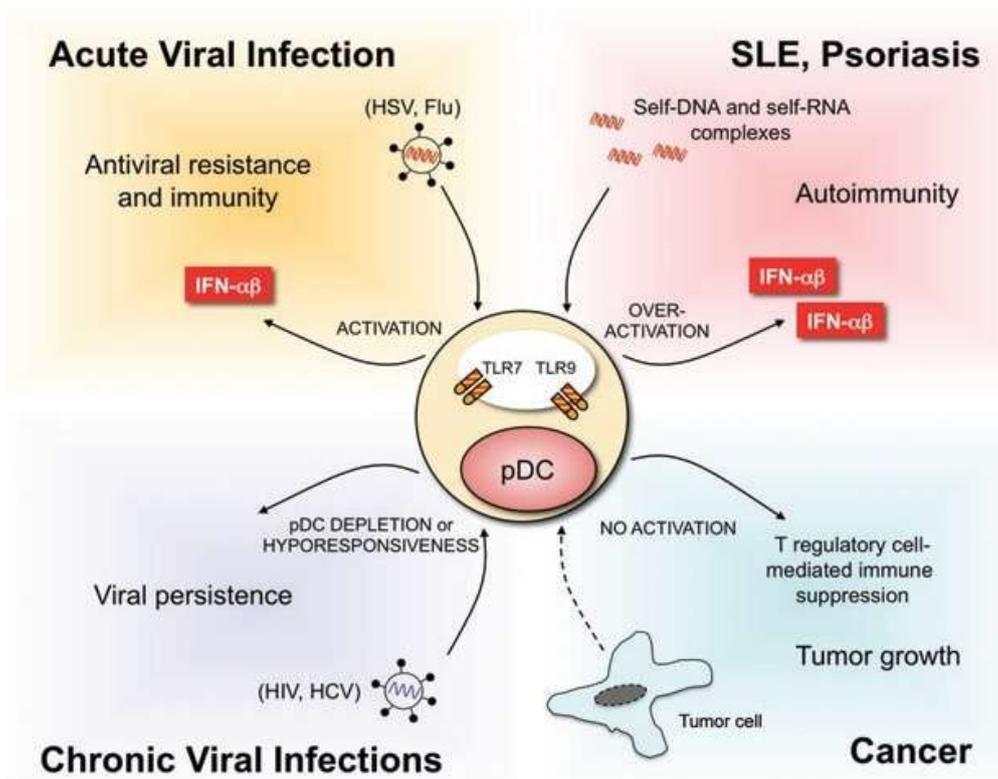
Ce phénomène est exploité dans le traitement des carcinomes basocellulaires et des lymphomes cutanés à cellules T avec l'injection d'imiquimod. L'imiquimod est un analogue synthétique de nucléoside reconnu par le TLR7. Utilisé en traitement local dans ces tumeurs de la peau, l'imiquimod entraîne un fort recrutement des pDC. Elles vont alors s'activer et produire de l'IFN de type 1 et des cytokines pro-inflammatoires. Cette réponse inflammatoire va permettre l'élimination de la tumeur (Urosevic et al., 2005; Palamara et al., 2004).

Le même effet est observé avec l'utilisation de séquences nucléotidiques synthétiques portant des motifs CpG. Injectés dans la tumeur, ces CpG ODN vont activer les pDC via leur TLR9 et entraîner une régression de la tumeur chez des patients ayant des carcinomes basocellulaires et des mélanomes de la peau à métastase (Hofmann et al., 2008).

Les pDC peuvent également jouer un rôle antitumoral en agissant sur d'autres cellules de l'immunité innée comme les cellules NK. C'est par exemple le cas dans un modèle de mélanome murin. Les pDC, après activation, produisent des chimiokines comme CCL3, -4 et -5. Ces chimiokines vont attirer les cellules NK au niveau de la tumeur où elles seront en contact avec l'IL-12 et l'IFN $\alpha$  produit par les pDC. Elles vont également entrer en contact direct avec les pDC via l'interaction OX40/OX40L. Ces différents signaux vont entraîner l'activation des cellules NK qui, grâce à leur pouvoir cytolytique ainsi potentialisé, vont lyser les cellules tumorales. Cette lyse des cellules tumorales entraîne la libération d'Ag tumoraux qui vont être capturés par les cDC. Ces cDC vont alors migrer vers les ganglions où elles vont pouvoir présenter ces Ag aux LT cytotoxiques spécifiques de la tumeur par présentation croisée. Ceci va ajouter un niveau de lutte supplémentaire contre la tumeur et permettre une meilleure élimination des cellules tumorales (Liu et al., 2008).

Les pDC pourraient également avoir un rôle anti-tumoral via leur expression de TRAIL qui a été décrite comme cytotoxique envers une lignée de cellules tumorales, les JURKAT, in vitro (Stary et al., 2007).

Le rôle des pDC en pathologie apparaît donc très important. En effet, les pDC peuvent être responsables de l'établissement d'un environnement immunosuppresseur autour de tumeurs ou d'une tolérance lors de certaines infections. Leur état d'inactivation joue un rôle important dans ce phénomène. Tout comme un état d'activation incontrôlé peut entraîner des maladies autoimmunes (Figure 13). Les stratégies thérapeutiques envisagées cherchent donc à modifier cet état d'activation avec des ligands des TLR7 et -9.



**Figure 13 - Les pDC en pathologie humaine.** D'après Lande, Ann NY Acad Sci, 2010. Lors d'une infection virale aiguë, les pDC sont activées et produisent de grandes quantités d'IFN de type I après reconnaissance des acides nucléiques viraux par les TLR7 et 9 endosomaux. L'IFN de type I produit confère une résistance antivirale et initie l'immunité antivirale en activant les cDC, LT, cellules NK et LB. Dans les cas d'infections virales chroniques, les pDC sont soit déplétées soit deviennent fonctionnellement inertes face à une stimulation virale. L'absence de production d'IFN de type I entraîne la persistance du virus et la chronicité de l'infection. Lors de maladies auto-immunes, les pDC détectent en continue des complexes d'acides nucléiques dérivés de l'hôte. Ceci conduit à une production excessive d'IFN de type I et donc à une activation continuelle des cDC qui entraîne l'autoimmunité. Lors de cancer, les pDC s'accumulent dans la tumeur en absence de signaux activateurs. Ces pDC non-activées induisent et maintiennent des LTreg, créant un micro-environnement immunosuppresseur autour de la tumeur, favorisant ainsi son développement.

## Les sous-populations de pDC

Les pDC, comme les cDC, ne sont pas une population entièrement homogène, tant sur le plan phénotypique que fonctionnelle. En effet, il a été décrit chez la souris plusieurs **sous-populations de pDC** distinguées suivant leur expression ou non d'un marqueur, mais cela se révèle aussi lié à un rôle différent des deux sous-populations.

La toute première observation de populations distinctes de pDC chez la souris a été faite en 2005. Deux populations de pDC ont été différenciées sur leur expression de **CD4**. A partir des cellules NK1.1- TCR $\alpha\beta$ - CD11c+ B220+, phénotype des pDC, les deux populations CD4+ et CD4- peuvent être purifiées. Les pDC CD4- représentent majoritairement la population de pDC recrutée et localisée dans les ganglions périphériques de par leur expression plus importante du CCR7 et de CD62L, produisent de plus grandes quantités d'IFN $\alpha$  ainsi que de l'IL-12p40 et les cytokines proinflammatoires IL-6 et TNF $\alpha$ . Cette population a aussi une capacité à induire la prolifération des T plus importante que les pDC CD4+. Leur expression du TLR9 au niveau ARNm est identique même si, en terme de production de cytokine, les pDC CD4- répondent plus fortement aux ligands de TLR9. Il a été montré que les pDC CD4- pouvaient spontanément acquérir l'expression du CD4 alors que les pDC CD4+ ne perdaient pas leur expression du CD4. On pouvait donc penser que l'expression du CD4 était acquise avec la maturation des pDC. Mais des arguments invalident cette hypothèse. Dans le sang périphérique des souris saines, les pDC sont CD4-. Chez les animaux ayant reçu systématiquement du CpG, on n'observe pas d'augmentation du nombre de pDC CD4+ en comparaison avec les souris contrôles. De plus les pDC CD4+ n'expriment pas de molécules de co-stimulation. Si seules les pDC CD4- sont retrouvées en périphérie, les deux populations sont retrouvées dans la rate, le thymus, les ganglions lymphatiques, la moelle osseuse et le foie. Les pDC CD4- semblent donc être la première ligne de défense contre les infections virales alors que les pDC CD4+ répondent moins aux ligands de TLR (Yang et al., 2005).

Un autre groupe a différencié deux populations de pDC suivant leur expression de **Ly49Q**. Ly49Q est une protéine membranaire de la famille des lectines de type II. Les deux populations sont retrouvées dans la moelle osseuse et produisent toutes deux de grandes quantités d'IFN $\alpha$  en réponse à différents stimuli comme des CpG ODN et des virus. Il faut toutefois noter que les pDC Ly49Q- répondent faiblement au virus de l'influenza en ce qui concerne leur production d'IFN, et produisent nettement moins de cytokines proinflammatoires que les pDC Ly49Q+. Les pDC Ly49Q- sont absentes de la périphérie et

deviennent Ly49Q+ après quelques jours de culture en présence de Flt-3L. Tout ceci laisse penser que les pDC Ly49Q- seraient des pDC à un **état moins différencié** et deviendraient Ly49Q+ avant de migrer en périphérie (Kamogawa-Schifter et al., 2005).

Dans les tissus lymphoïdes chez la souris, 20 à 30% des pDC sont **CCR9-** alors que les autres expriment ce récepteur de chimiokine pour CCL25. Les **pDC CCR9+** ont un phénotype plus **immature** que les pDC CCR9- qui expriment plus fortement les molécules de costimulation. De plus, les pDC CCR9+ migrent en réponse au CCL25 ce qui paraît logique, mais ne migrent pas en réponse au CCL21 un ligand du CCR7 exprimé sur les pDC matures. En stimulation par des ligands de TLR, la moitié des pDC CCR9+ deviennent CCR9- et surexpriment les molécules de costimulation ainsi que du CMH II. Ceci laisse supposer que CCR9 serait un marqueur présent sur les pDC immatures. De plus ces pDC CCR9+ induisent des **Treg suppresseurs** et suppriment la prolifération des Teff, ce qui confirme encore cette hypothèse. De manière étonnante, l'injection concomitante de pDC CCR9+ et de Teff allogéniques à des souris déplétées en T sauve les souris de la mort par une **GVHD** par l'induction de Treg. CCR9 peut donc servir de marqueur de maturation pour les pDC mais aussi permettre de différencier des **pDC tolérogènes** des autres (Hadeiba et al., 2008b). Mais les résultats de cette étude ont été remis en cause quelques mois plus tard par un autre groupe qui a montré que les pDC CCR9+ ne sont pas reconnues par **mPDCA1** (CD317), un marqueur spécifique des pDC, remettant ainsi en cause la nature de ces cellules. Ce même groupe a également montré que ces cellules étaient en fait des précurseurs des cDC CD8+ et CD8- (Segura et al., 2009).

Chez la souris, dans les ganglions drainant la tumeur, les pDC expriment IDO comme décrit dans la partie tolérance. Cette expression apparaît restreinte à une population de pDC CD19+, alors que les pDC n'expriment classiquement pas ce marqueur B. Il est toutefois important de noter que cette population dite de pDC CD19+ n'est pas reconnue par l'Ac 120G8, un Ac monoclonal spécifique des pDC de souris. Il n'est donc pas absolument certain que cette population corresponde à des pDC.

Chez l'homme ont été décrites récemment des sous-populations de pDC. Ces deux populations diffèrent par leur expression du **CD2** et sont retrouvées dans le sang et les amygdales. Les **pDC CD2<sup>high</sup>** sont en plus retrouvées dans certaines biopsies de tumeurs suggérant un rôle dans l'immunité antitumorale. Les deux populations expriment le granzyme B et TRAIL et produisent de l'IFN $\alpha$  après activation. Les pDC CD2<sup>high</sup> induisent la prolifération des LT alors que les **pDC CD2<sup>low</sup>** n'ont qu'une activité limitée. Ceci s'accompagne d'une

expression supérieure de CD80 sur les pDC CD2<sup>high</sup> ainsi que d'une production d'IL-12p40 seulement par cette population. Les pDC CD2<sup>high</sup> expriment aussi de manière importante et exclusive, comparé aux pDC CD2<sup>low</sup>, le **lysozyme** qui est normalement retrouvé dans les cellules myéloïdes comme les neutrophiles et les monocytes ainsi que dans les cellules épithéliales. Le lysozyme joue un rôle dans la destruction de la paroi bactérienne (Fleming, 1922).

Très récemment, il a été décrit deux populations de pDC parmi les cellules BDCA-4+. En effet, on peut distinguer une population légèrement plus petite et légèrement plus granuleuse qui est également **CD123<sup>low</sup>**, les **pDC2**. Les **pDC1** sont **CD123<sup>high</sup>** et montrent une expression plus faible du CD86, TLR2 et CD58 après maturation comparé aux pDC2. Elles expriment de manière identique les autres TLR. De plus, en culture avec des LT naïfs allogéniques, les pDC1 induisent plutôt des **LT producteurs d'IL-10** alors que les pDC2 des **Th17**. Ces deux populations ont été étudiées chez des patients atteints de sclérose en plaques. En effet, chez des donneurs sains, les pDC1 sont majoritaires et représentent environ 65% des pDC alors que chez les patients atteints de sclérose en plaques, ce sont les pDC2 qui sont représentés environ 60% des pDC. Ceci peut laisser suggérer une implication des Th17 dans cette pathologie. Le ratio normal entre les deux populations peut être retrouvé après traitement des patients avec de l'**IFNβ** (Schwab et al., 2010). L'implication de ces deux populations dans la maladie reste toutefois à être prouvée.

Chez le rat il n'a pas encore été décrit de populations de pDC différentes.

La mise en évidence de ces différentes populations de pDC peut apporter une explication aux rôles différents que peuvent jouer les pDC en pathologies, ayant tantôt un effet bénéfique tantôt un effet néfaste pour l'organisme.

### III. La triade TRANCE-RANK-OPG

Le système osseux est un tissu complexe aux multiples fonctions. C'est notamment le site de l'hématopoïèse et le réservoir du calcium et de phosphore de l'organisme. De nombreux mécanismes d'interaction entre le système osseux et le système immunitaire ont été mis en évidence au cours des dernières années. L'étude des interactions entre ces deux systèmes est appelée l'**ostéoimmunologie** (Arron et Choi, 2000). De nombreuses preuves de cette connexion entre les systèmes existent. Des cellules de la **lignée ostéoblastique**, cellules qui assurent la formation de l'os, sont des régulateurs importants de l'hématopoïèse (Taichman et Emerson, 1994). Les **ostéoclastes**, cellules assurant la résorption osseuse, sont issus du même progéniteur myéloïde que les DC et les macrophages (Xing et al., 2005). De plus, les cDC gardent la capacité à se transdifférencier en ostéoclaste mature (Alnaeeli et al., 2006). Il est également bien décrit maintenant que de nombreux facteurs solubles du système immunitaire comme des cytokines, chimiokines et facteurs de croissance régulent également l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes (Herman et al., 2008). Les cytokines produites par les cellules immunitaires activées jouent donc un rôle important dans les pathologies ostéo-articulaires comme la polyarthrite rhumatoïde, par exemple.

#### TRANCE

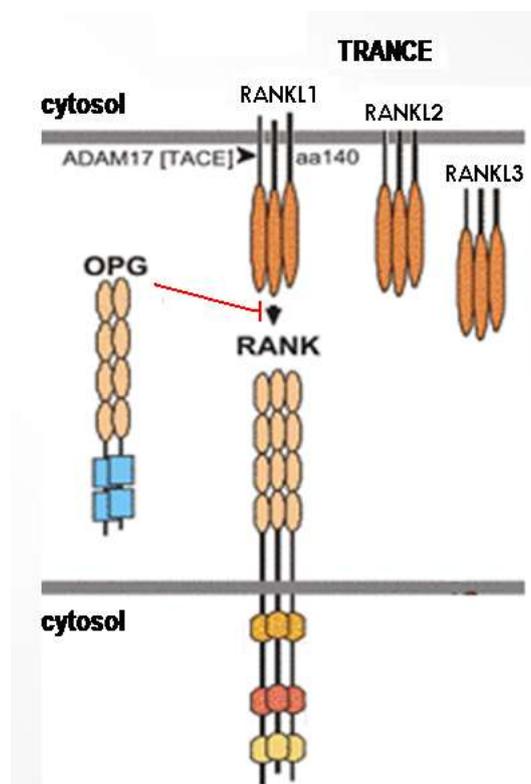
La découverte de trois molécules essentielles contrôlant les fonctions ostéoclastiques, intervenant dans l'ostéoporose et d'autres maladies osseuses a radicalement changé la recherche sur le système osseux. Ces trois molécules sont **TRANCE** (TNF-related activation-Induced cytokine) et ses deux récepteurs : **RANK** (Receptor activator of NF- $\kappa$ B) et **OPG** (ostéoprotégérine).

TRANCE est aussi appelé **RANK ligand** (RANKL), **OPG ligand** (OPGL) et **ODF** (osteoclast differentiation factor). Tous ces noms s'expliquent par le fait que cette protéine fut découverte par deux groupes simultanément (Anderson et al., 1997; Wong et al., 1997b).

#### Structure

Le gène codant TRANCE chez l'homme est localisé sur le chromosome 13 et contient 6 exons. La forme principale provient d'un transcrit de 2 271 paires de bases (bp) et code pour une **protéine transmembranaire de type II** (Figure 14). Elle existe aussi sous deux autres isoformes: une seconde forme membranaire ne contenant pas le domaine intracellulaire (hRANKL2) et une forme soluble composée uniquement du domaine extracellulaire (hRANKL3) (Suzuki et al., 2004). Les formes membranaires peuvent être libérées sous forme soluble par clivage enzymatique sous l'action de la métalloprotéase TACE (ou ADAM17). Ces trois isoformes sont aussi présentes chez la souris (Ikeda et al., 2001).

La protéine TRANCE est un membre de la superfamille du TNF et est très conservée entre les espèces (87% d'homologie entre les séquences humaine et murine). C'est une protéine composée de 317 aa (35,5 kDa, 45 kDa après glycosylation) chez l'homme et de 316 aa chez la souris. Elle s'assemble spontanément sous forme d'un **homotrimère** stable de manière non-covalente. La forme soluble présente une activité biologique identique aux formes membranaires (Lacey et al., 1998). La protéine TRANCE a deux récepteurs : RANK et OPG. L'OPG est présent sous forme soluble et joue le rôle d'inhibiteur de la reconnaissance de TRANCE par son récepteur membranaire RANK (Figure 14).



**Figure 14 - Représentation de la triade TRANCE/RANK/OPG.** La protéine TRANCE est présente sous trois isoformes: une forme complète, une forme ne présentant plus la partie intracellulaire et une forme soluble qui ne contient ni la partie intracellulaire ni la partie transmembranaire. La forme membranaire peut être relarguée sous forme soluble par clivage protéolytique par une métalloprotéase, TACE. Son

récepteur est RANK. Il existe également une forme soluble du récepteur, l'OPG, qui joue un rôle inhibiteur de l'interaction entre TRANCE et RANK.

## Expression

L'expression de l'ARNm de TRANCE peut être détectée fortement dans le squelette et les tissus lymphoïdes, mais aussi dans les kératinocytes de la peau, dans les cellules épithéliales des glandes mammaires, dans le cœur, les muscles squelettiques, les poumons, l'estomac, le placenta, les glandes thyroïdes et le cerveau (Fata et al., 2000b; Kartsogiannis et al., 1999; Loser et al., 2006). L'expression de la protéine TRANCE reste la plus décrite sur les **ostéoblastes**, les **cellules stromales**, les **lymphocytes T activés** ainsi que sur diverses cellules cancéreuses (Blair et al., 2006).

La transcription, la traduction et les modifications post-traductionnelles de TRANCE sont régulées par de nombreux facteurs comme des **hormones parathyroïdiennes**, la **vitamine D3** (Tsukii et al., 1998), les **cytokines** (IL-1 $\beta$ , IL-11, IL-6, IL-17, ...) (Hofbauer et al., 1999; Duplomb et al., 2008; Horwood et al., 1998; Kotake et al., 1999), les **facteurs de croissance** (TGF- $\beta$ , BMP-2, ...) (Takai et al., 1998; Usui et al., 2008), certains **peptides, immunosuppresseurs** et d'autres facteurs comme la vitamine C, le LPS ou le calcium.

## Les récepteurs de TRANCE

**RANK** est une protéine transmembranaire de type 1 de 616 aa chez l'homme et de 625 aa chez la souris. L'homotrimérisation de RANK est nécessaire pour la reconnaissance de TRANCE et la transmission du signal approprié. L'ARNm de RANK est abondant dans les DC, l'os, les muscles squelettiques, le thymus, le foie, le colon, l'intestin grêle et les glandes surrénales. La protéine est quant à elle détectée à la surface des DC matures, des LT CD4+ et CD8+, des cellules de Langerhans et bien sûr des ostéoclastes (Loser et al., 2006; Josien et al., 1999; Wong et al., 1997a). Son expression est également retrouvée dans les cellules épithéliales mammaires où elle est régulée tout au long de la grossesse (Fata et al., 2000a).

Des souris KO pour le gène RANK présentent le même défaut d'ostéoclastogénèse que les souris KO pour TRANCE, confirmant le fait que RANK est l'unique récepteur de TRANCE. Des études ont néanmoins montré la génération in vitro d'ostéoclastes en l'absence de RANK ou de sa molécule de signalisation TRAF6 et en présence d'un cocktail de cytokines et de facteurs de croissance (Kim et al., 2005b). Toutefois, la validité de ces résultats in vitro peut

être mise en question étant donné qu'aucun ostéoclaste n'a pu être détecté dans les animaux déficients pour le gène RANK (Li et al., 2000). Il est plus probable que ces cytokines et facteurs de croissance produits lors d'une inflammation ou de manière physiologique agissent de manière parallèle pour moduler la réponse des ostéoclastes et de leurs précurseurs à l'interaction TRANCE-RANK.

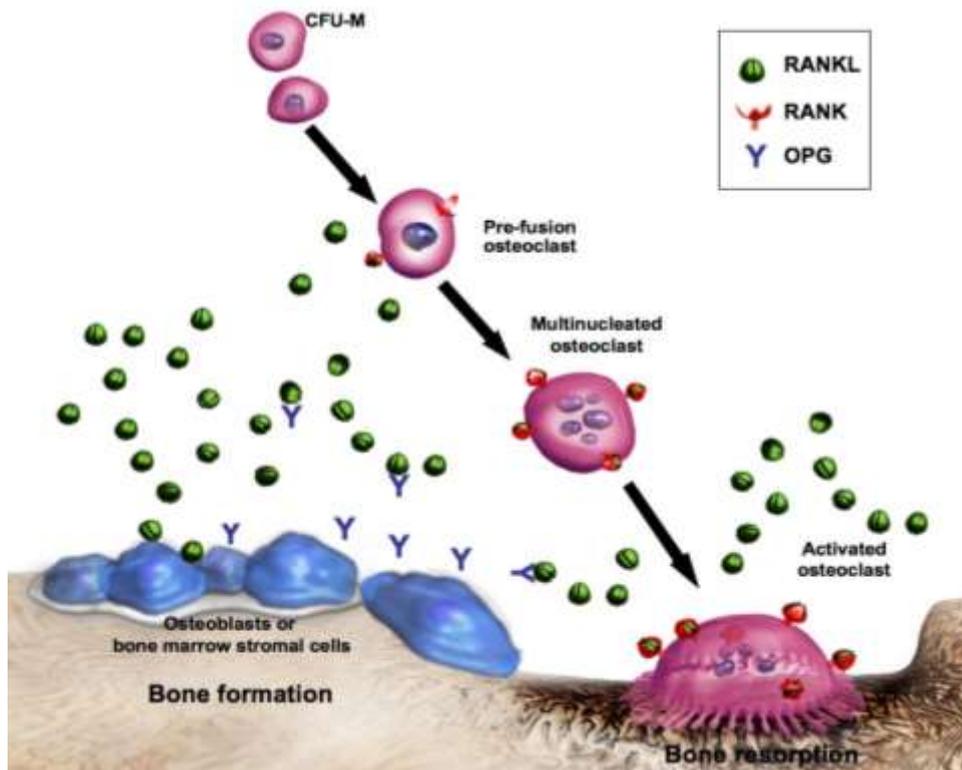
L'**OPG** est une protéine soluble agissant comme **inhibiteur** de l'ostéoclastogénèse en bloquant l'interaction de TRANCE avec son récepteur RANK. En effet, quand l'OPG est surexprimé par un transgène chez des souris, elles présentent une forte ostéopétrose, corrélant avec une ostéoclastogénèse inhibée (Simonet et al., 1997). Il est produit par différents types cellulaires comme les cellules stromales, les LB et les DC (Yun et al., 1998). En plus de se lier à TRANCE, OPG reconnaît aussi TRAIL (Emery et al., 1998). Il pourrait ainsi améliorer la survie cellulaire en bloquant l'action cytotoxique de TRAIL.

## Effets biologiques

### Ostéoclastogénèse

La fonction la plus connue de TRANCE est son rôle indispensable dans l'induction de l'**ostéoclastogénèse**, correspondant à la formation des ostéoclastes. Une démonstration simple a été l'utilisation de souris déficientes pour le gène TRANCE. Ces souris présentent une **sévère ostéopétrose**, caractérisée par une augmentation de la densité osseuse, due à une absence totale d'ostéoclastes (Dougall et al., 1999).

Les ostéoclastes proviennent de CSH qui entrent dans la lignée monocyte-macrophage avec des progéniteurs nommés **CFU-M** (colony forming unit- monocyte). Ces progéniteurs se différencient en précurseurs mononucléés qui en présence de TRANCE vont fusionner et former des ostéoclastes au repos. Ces ostéoclastes, toujours en présence de TRANCE pourront devenir complètement actifs et acquérir ainsi leur fonction de résorption osseuse. L'OPG intervient pour bloquer TRANCE et ainsi réguler négativement l'ostéoclastogénèse (Figure 15) (Boyle et al., 2003).



**Figure 15 – Ostéoclastogénèse.** Schématisation de la différenciation des précurseurs de la MO (CFU-M) jusqu'à la formation d'ostéoclastes matures. Ceci passe par la formation de cellules multinucléées. M-CSF et TRANCE sont indispensables pour ce mécanisme. TRANCE est produit par les ostéoblastes et les cellules stromales. L'OPG peut neutraliser TRANCE et bloquer l'ostéoclastogénèse. D'après <http://cancergrace.org/cancer-101/2009/04/16/intro-to-denosumab/>

## Rôle de TRANCE dans le système immunitaire

Au cours des dernières années, l'implication du rôle joué par TRANCE dans le système immunitaire est décrite par de plus en plus de publications.

L'étude des souris KO pour le gène TRANCE a révélé un phénotype inattendu. En effet ces souris présentent une absence totale de ganglions lymphatiques, démontrant ainsi l'importance de cette molécule dans le développement des OLS (Dougall et al., 1999). En effet, TRANCE induit l'expression des lymphotoxines  $\alpha\beta$  sur les cellules inductrices des tissus lymphoïdes (en anglais lymphoid tissue inducer cells : Lti cells). Ces cellules présentes dans les ébauches embryonnaires assurent le développement des ganglions lymphatiques (Yoshida et al., 2002). Les souris TRANCE-KO présentent des plaques de Peyer mais d'une taille réduite, suggérant la contribution de TRANCE dans le développement des plaques de Peyer. Ces plaques de Peyer, retrouvées dans l'intestin, présentent un épithélium particulier. En effet, ces zones ne présentent pas de fonctions digestives ni de défenses antibactériennes, facilitant l'accès aux micro-organismes. Dans ces zones on trouve des cellules toutes aussi particulières,

les cellules dites M (microfold en anglais). Ces cellules M ont la capacité de transporter toutes sortes de particules, bactéries et virus présents dans la lumière intestinale et de les délivrer aux DC, aux macrophages, aux LT ainsi qu'aux LB qui sécréteront des IgA en réponse à ces pathogènes. Il a été démontré que TRANCE était indispensable et suffisant pour le développement des cellules M. En effet, les souris TRANCE-KO présentent une sévère déficience en cellules M qui peut être corrigée par l'injection de TRANCE soluble (Knoop et al., 2009). TRANCE est aussi indispensable pour le développement des glandes mammaires (Fata et al., 2000a).

TRANCE est exprimé sur les LT CD4+ ou CD8+ activés (Josien et al., 1999) et son récepteur RANK est, quant à lui, exprimé sur les cDC mature. TRANCE exprimé sur les LT peut interagir avec RANK à la surface des DC, augmentant ainsi leur taux de survie, par la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL, et leur capacité à induire la prolifération des LT naïfs (Wong et al., 1997a). L'interaction TRANCE-RANK est aussi nécessaire à la production de cytokines comme l'IL-12. En effet, il existe un modèle de souris déficientes pour le gène CD40L dans lequel ces souris présentent un défaut de production d'IL-12 et sont sensibles à des pathogènes comme par exemple *Leishmania major*, alors que la souche non déficiente pour le gène CD40L est résistante à ce pathogène. Ces souris CD40L-/- ont toutefois la capacité de contrôler l'infection par le même parasite mais injecté au stade promastigote, et produisent un taux normal d'IL-12. Cette résistance est levée par l'inhibition de l'interaction TRANCE-RANK, montrant un rôle important de cette interaction TRANCE-RANK dans la production d'IL-12 et l'induction de réponse Th1 (Padigel et al., 2001, 2003).

TRANCE agit aussi pendant la sélection des thymocytes. En effet, l'interaction TRANCE-RANK, via la molécule de signalisation TRAF6, est nécessaire au développement de **cellules épithéliales médullaires thymiques** (mTEC) exprimant le facteur de transcription **AIRE**. Les mTEC exprimant AIRE jouent un rôle fondamental dans la prévention des maladies autoimmunes en présentant des Ag des tissus et en éliminant les thymocytes potentiellement autoréactifs (Anderson et al., 2005; Cheng et al., 2007).

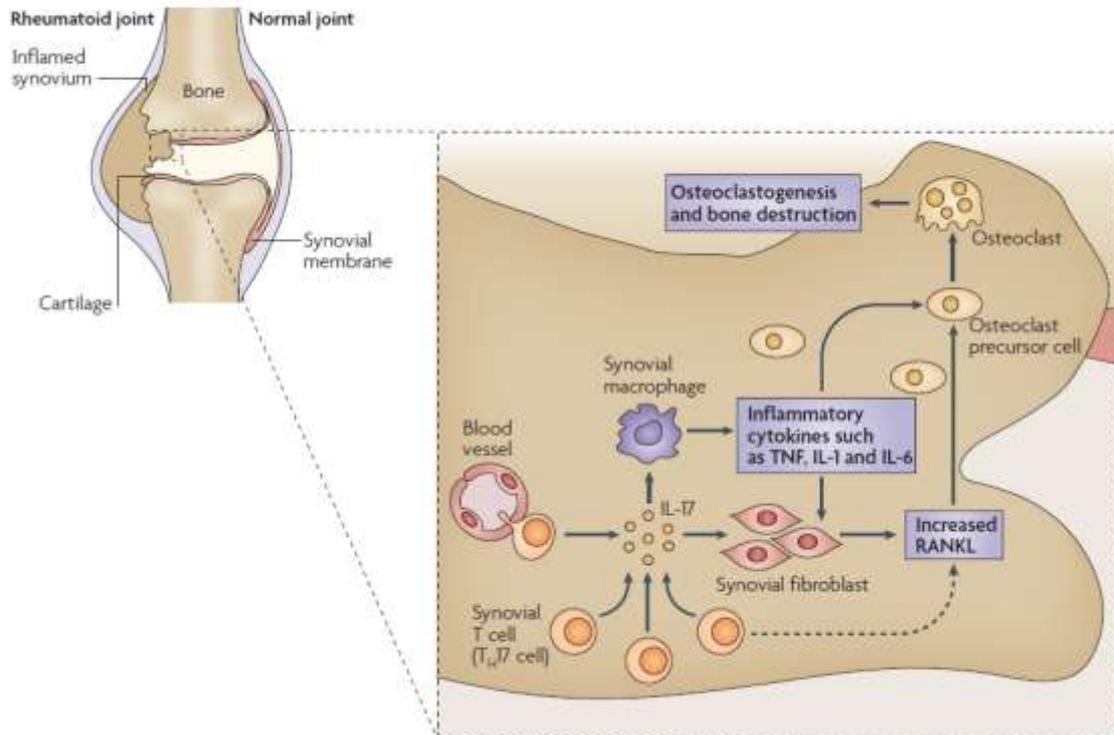
## **Implication de la triade en pathologie**

Les pathologies osseuses révèlent toutes un dérèglement de la balance entre résorption et formation osseuse. Le cas le plus évident est bien sûr dans l'**ostéoporose**. Cette maladie fréquente chez la femme après ménopause entraîne une fragilité excessive du squelette due

à une diminution de la masse osseuse. Ceci est bien entendu causé par une activité prédominante des ostéoclastes, due entre autre à la carence en hormones, notamment les œstrogènes. Pour contrecarrer ce phénomène, il serait envisageable de bloquer l'ostéoclastogénèse pour remédier à la résorption osseuse excessive. C'est ce qui a été fait avec la génération d'un Ac monoclonal dirigé contre TRANCE, le Denosumab (Pageau, 2009). Injecté en sous-cutané, ce traitement prévient la perte de masse osseuse et améliore la densité osseuse chez les patientes.

Les **tumeurs malignes osseuses primaires**, aussi appelées **ostéosarcomes**, sont à l'inverse une formation de substance ostéoïde excessive par les ostéoblastes. Il est parallèlement observé une dégradation de l'os sain sur le site de développement de la tumeur. Des essais de transfert du gène OPG chez des souris dans un modèle d'ostéosarcome ont montré une nette diminution du développement de la tumeur, en bloquant l'ostéolyse associée, améliorant significativement la survie des animaux (Lamoureux et al., 2007). A noter que chez le rat, des **DC dites tueuses** (cDC CD4-) chargées avec un peptide de la tumeur osseuse préviennent le développement de la tumeur, pouvant même entraîner sa régression (Chauvin et al., 2008).

La triade est aussi impliquée dans des maladies autoimmunes comme **la polyarthrite rhumatoïde**. Dans cette pathologie, l'inflammation de la synovie dans les articulations est accompagnée par une dégradation de l'os et du cartilage. Cette pathologie est un parfait exemple d'ostéoimmunologie. Au niveau du site d'inflammation, il y a un recrutement important de LT Th17 qui expriment TRANCE sous forme membranaire et soluble. Ces LT Th17 ont la capacité d'induire la différenciation de monocytes en ostéoclastes. Ils peuvent aussi augmenter l'expression de TRANCE sur les cellules stromales, augmentant ainsi l'ostéoclastogénèse au niveau des articulations inflammées (Sato et al., 2006a) (Figure 16).



**Figure 16 - Rôle des LT Th17 dans l'arthrite rhumatoïde.** D'après Takayanagi, Nat Rev, 2007. Dans les cas d'arthrite rhumatoïde, l'inflammation de synovie envahit et détruit l'os. Les cellules de la synovie sont des macrophages et des fibroblastes, des DC, des cellules endothéliales et des LT infiltrants. Les LTh17 sont les LT pro-ostéoclastiques. Ils ne produisent pas d'IFN $\gamma$  qui supprime la voie de signalisation TRANCE, mais sécrètent beaucoup d'IL-17 qui induit l'expression de TRANCE par les fibroblastes de la synovie. L'IL-17 stimule également l'inflammation locale et active les macrophages à produire des cytokines pro-inflammatoires. Ces cytokines activent l'ostéoclastogénèse soit directement en agissant sur les précurseurs des ostéoclastes, soit en induisant l'expression de TRANCE sur les fibroblastes de la synovie. Les LT Th17 expriment également TRANCE à leur surface, ce qui contribue également à augmenter l'ostéoclastogénèse.

Des études ont également établi un lien possible entre l'ostéoporose et les **calcifications vasculaires**. Chez des souris KO pour le gène OPG, on observe une calcification de l'aorte et des artères rénales (Collin-Osdoby, 2004). TRANCE, RANK et OPG sont exprimés par les cellules endothéliales et les cellules des muscles lisses vasculaires. OPG semble donc intervenir pour protéger ces artères d'une calcification précoce (Bucay et al., 1998).

Ces exemples ne représentent pas une liste exhaustive des pathologies dans lesquelles la triade TRANCE/RANK/OPG est impliquée. En effet elle est aussi impliquée dans différents cancers comme le **cancer de la prostate** (Holen et al., 2002), du **sein** (Neville-Webbe et al., 2004), dans le **myélome multiple** (Terpos et Dimopoulos, 2005). Il a récemment été suggéré son implication dans certaines complications dues à des **maladies rénales chroniques**. En effet, les patients atteints de ces maladies présentent un risque accru d'ostéoporose et de problèmes vasculaires (Klejna et al., 2009). Il a également été montré dans un modèle

d'**allogreffe cardiaque** chez la souris et le rat que la neutralisation de TRANCE dans le greffon, par injection d'un adénovirus codant une protéine de fusion RANK-Ig, augmentait significativement la survie du greffon (Guillonnet et al., 2004). La même observation a été faite dans un modèle de greffe d'îlot pancréatique chez la souris (Wojtuszczyński et al., 2009).

De manière plus surprenante, une récente étude a montré que TRANCE et RANK sont exprimés dans le système nerveux central et qu'ils contrôlent la **fièvre** et la **thermorégulation**. En effet, l'injection intra-ventriculaire de TRANCE provoque presque instantanément une forte fièvre (Hanada et al., 2009).

La triade TRANCE/RANK/OPG est impliquée dans de nombreuses pathologies liées plus ou moins directement au métabolisme osseux et apparaît être une cible thérapeutique de choix dans de nombreuses études pathologiques.

---

# Résultats

---

## Objectifs de l'étude

Depuis de nombreuses années déjà, l'image du rat dans la médecine a été valorisée. Il n'est plus considéré uniquement comme un porteur de maladies contagieuses mais comme un outil indispensable dans la médecine expérimentale mais aussi dans le développement de médicament. Physiologiquement plus proche de l'homme que la plupart des espèces utilisées en laboratoire, le rat représente un modèle clé dans l'étude de nombreuses pathologies humaines, telles que les maladies métaboliques (diabète, obésité, ...), les maladies cardiovasculaires (athérosclérose, hypertension, ...), les maladies neurologiques (maladies d'Alzheimer, neurodégénératives, ...), mais aussi dans bien d'autres domaines tels que la chirurgie, la transplantation et le cancer.

Au sein de l'unité INSERM U643, dont la thématique est l'immunointervention dans les allo et les xénotransplantations, notre équipe s'intéresse à la biologie des populations de cellules dendritiques et à leur spécialisation fonctionnelle notamment chez le rat. Notre équipe a précédemment caractérisé deux populations de cDC chez le rat, de phénotype CD103<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> (DC CD4<sup>-</sup>) et CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> (DC CD4<sup>+</sup>) dans les organes lymphoïdes (Voisine et al., 2002). Plus récemment notre équipe a caractérisé l'homologue des pDC chez le rat de phénotype **CD11c<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup> CD103<sup>-</sup> CD4<sup>high</sup> CD45R<sup>+</sup>** (Hubert et al., 2004).

Afin de faciliter la purification et l'étude des pDC de rat, un anticorps monoclonal dirigé contre les pDC spléniques de rat a été généré. Cet Ac, baptisé 85C7, permet une purification plus efficace des pDC de rat. De manière inattendue, une population 85C7<sup>+</sup> CD45R<sup>+</sup> CD4<sup>low</sup> a pu être identifiée.

Les objectifs de cette étude ont été de caractériser cette nouvelle population de cellules afin de déterminer s'il s'agissait d'une sous-population de pDC et d'analyser leur rôle :

- La première étape a été de déterminer si cette population 85C7<sup>+</sup> CD45R<sup>+</sup> CD4<sup>low</sup> correspondait à une sous-population de pDC, comme déjà décrit chez la souris (Yang et al., 2005) et chez l'homme (Schwab et al., 2010; Matsui et al., 2009).
- Dans un second temps des puces à ADN ont été réalisées sur ces deux populations, compilées avec des puces à ADN précédemment effectuées sur les DC CD4<sup>+</sup> et DC CD4<sup>-</sup>, pour mieux caractériser les gènes différentiellement exprimés par ces

différentes populations de DC chez le rat et plus particulièrement les gènes spécifiquement exprimés par les deux populations de pDC.

- Enfin, l'analyse plus précise d'un gène identifié dans cette étude d'expression globale à été effectuée. En effet, le gène codant la protéine TRANCE apparaissait constitutivement et spécifiquement exprimé par les pDC CD4<sup>high</sup> fraîches chez le rat. Nous avons donc vérifié cette expression inattendue au niveau protéique et chercher un rôle fonctionnel à cette expression de TRANCE par les pDC.

# **I. Caractérisation des sous-populations de pDC chez le rat**

## **Article 1 : 85C7, un nouvel anticorps monoclonal permettant la discrimination de deux populations de pDC chez le rat**

Thomas Anjubault, François-Xavier Hubert, Michèle Heslan et Régis Josien

Résumé de l'article 1 :

Les cellules dendritiques (DC) sont des cellules présentatrices de l'antigène (CPA) jouant un rôle clé dans l'induction de l'immunité adaptative. Diverses sous-populations de DC avec des phénotypes et des fonctions différentes ont été décrites chez l'homme, la souris et le rat. Les deux principales populations de DC connues sont les DC conventionnelles (cDC) et les DC plasmacytoïdes (pDC). Les pDC sont connues pour produire d'énormes quantités d'IFN de type 1 en réponse à une infection virale, corrélant avec leur expression des TLR 7 et 9. Différentes sous-populations de pDC avec des phénotypes et des fonctions différentes ont été décrites chez l'homme et la souris. Chez la souris, par exemple, deux populations de pDC distinguées par leur expression du marqueur CD4 ont été décrites. Les pDC CD4<sup>-</sup> identifiées comme la principale source de pDC migrant vers les ganglions lymphatiques lors d'une infection. Chez le rat, les pDC ont un phénotype CD11b<sup>-</sup> CD103<sup>-</sup> CD45R<sup>+</sup> CD4<sup>high</sup>. La génération d'un Ac monoclonal des pDC de rat, nommé 85C7, en vue de la simplification de leur purification et de leur étude a permis d'identifier de manière inattendue une population de cellules 85C7<sup>+</sup> CD45R<sup>+</sup> CD4<sup>low</sup>. Les deux populations présentent une répartition différente dans l'organisme avec une prédominance des cellules 85C7 CD4<sup>low</sup> dans la moelle osseuse et des pDC CD4<sup>high</sup> dans les organes lymphoïdes. Les deux populations présentent de fortes similarités morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles permettant d'identifier cette population 85C7<sup>+</sup> CD4<sup>low</sup> comme des pDC. Nous avons donc, au travers de cet article, identifiées les premières sous-populations de pDC chez le rat.

**Article en préparation**

## **85C7, a novel monoclonal antibody that allows the discrimination of two subsets of rat plasmacytoid dendritic cells**

Thomas Anjubault <sup>1,2</sup>, François-Xavier Hubert <sup>1,2</sup>, Michèle Heslan<sup>1,2</sup> and Régis Josien <sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup> INSERM UMR 643, F- 44000, France

<sup>2</sup> CHU Nantes, Institut de Transplantation – Urologie – Néphrologie (ITUN)

<sup>3</sup> Laboratoire d'immunologie, Nantes, F- 44000, France

<sup>4</sup> Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F- 44000, France

## Introduction

Dendritic cells (DC), as antigen presenting cells (APC), play a key role in the induction of adaptive immunity (Banchereau et Steinman, 1998). Several DC subsets with specific phenotype and function have been described in human and mouse model (Pulendran, 2004; Shortman et Liu, 2002). The two main DC populations that have been recognized are conventional DC (cDC) and plasmacytoid DC (pDC). In human model, they are mainly described regarding their expression of blood dendritic cells antigen (BDCA). These markers allow the identification of BDCA-1 DC and BDCA-3 DC which are cDC (Ju et al., 2010) and pDC which express BDCA-2 and BDCA-4 (Liu, 2005). In mice, cDC are composed of three main populations regarding their expression of CD4 and CD8. They are CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> DC (named CD8<sup>+</sup> DC) CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> DC (named CD4<sup>+</sup> DC) and CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> DC (named double negative DC (DN DC) (Villadangos et Schnorrer, 2007). Mouse pDC are characterized by the expression of specific markers as Siglec-H and mpDCA1 (Zhang et al., 2006). In rat model, splenic DC subsets are also divided in cDC, which are CD11b<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> CD45R<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup> DC) and CD11b<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> CD45R<sup>-</sup> CD4<sup>-</sup> (CD4<sup>-</sup> DC) (Voisine et al., 2002), and pDC CD11b<sup>-</sup> CD103<sup>-</sup> CD45R<sup>+</sup> CD4<sup>high</sup> (Hubert et al., 2004). pDC have been first described as plasmacytoid monocytes and plasmacytoid T cells. They were finally described as DC in the 1990s and as natural IFN-producing cells. Rat CD4<sup>-</sup> DC produces IL-10, IL-12 and induce Th1 differentiation of T cells. While CD4<sup>+</sup> DC produce IL-10 too but few IL-12 and promote Th1/Th2 T cell differentiation. In opposite, pDC do not secrete IL-10 but IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  and differentiate naïve T cells into Th1 cells. But their main characteristic is their enormous production of type 1 interferon (IFN) upon viral infection (Asselin-Paturel et Trinchieri, 2005) correlating to their Toll-like receptor (TLR) pattern expression to TLR7 and 9. Even if this particularity brings together all pDC, pDC subsets with different phenotype and function have been described. In human CD2<sup>+</sup> and CD2<sup>-</sup> pDC have been described with a possible cytotoxic activity for the CD2<sup>+</sup> pDC expressing lysozyme (Matsui et al., 2009). BDCA-4 pDC subsets expressing high or low levels of CD123 have also been described in patients with multiple sclerosis (Schwab et al., 2010). In mouse, CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>-</sup> pDC have been identified regarding their response to pathogens (Yang et al., 2005). In rat model, subsets of DC are not much studied and there is still no pDC subset identified.

In order to simplify the purification and the study of rat pDC, we generated a monoclonal antibody against rat splenic pDC, called 85C7. This antibody is now routinely

used in our laboratory to purify pDC on their 85C7+ CD45+ CD4<sup>high</sup> phenotype. Thanks to his antibody, we report herein the characterization of the first rat pDC subsets which are differentiated by their expression of CD4. Indeed, classical pDC are CD4<sup>high</sup> and this new subset is CD4<sup>low</sup>. Both populations are very similar in their phenotype, morphology and function but none of them is the precursor of the other one, confirming there are real distinct pDC subsets.

## Materials and Methods

### Animals

Lewis rats, from 8 to 12 week old, were obtained from the Centre d'Elevage Janvier (Le Genest St Isles, France).

### Reagents

. The phosphodiester oligonucleotide containing the CpG motif (CpG ODN) 2006 (tcgtcgttttgcgttttgcgtt) and 2216 (gggggacgatcgtcggggg) were synthesized by Eurofins MWG Operon. Monensine, brefeldin A and Concanavaline A were obtained from Sigma-Aldrich.

### Antibodies

CD4-Phycoerythrine (PE)-Cy7, CD45R-PE, CD3-FITC (G4.18), CD40-FITC (HM40.3), CD49b-FITC (Ha 1/29), CD80-FITC, CD-86-FITC monoclonal antibody were purchased from BD PharMingen (San Diego, CA). His48-FITC (Granulocytes) was purchased from AbD Serotec (Oxford, UK). 2D11, 3.2.3 (CD161), 3.4.1 (CD8 $\beta$ ), ED3 (Sialoadhesin), OX2 (CD200), OX6 (RT1B/MHC Class II), OX7 (CD90), OX8 (CD8 $\alpha$ ), OX12 (Ig $\kappa$ ), OX18 (RT1A/MHC class I), OX19 (CD5), OX22 (CD45RC), OX33 (CD45RA), OX34 (CD2), OX35 (CD4), OX39 (CD25), OX41 (SIRP $\alpha$ ), OX42 (CD11b/c), OX49 (CD44), OX85 (CD62I), R7/3 (TCR $\alpha\beta$ ), V65 (TCR $\gamma\delta$ ), Wen23 (NKP46) hybridomas were obtained from the European Collection of Cell Culture, and mAb were purified from supernatants followed or not by coupling to Alexa Fluor 647 and Alexa Fluor 488 (kits from Molecular Probes). The human Fc-FITC monoclonal antibody was purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. The Rank-human Fc fusion molecule was kindly provided by Yongwon Choi (University of Pennsylvania, Philadelphia).

### Dendritic cells

**Conventional DC.** DC CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>-</sup> were isolated as previously described (Voisine et al., 2002). Briefly, after digestion in collagenase, low density spleen cells were selected on a 14.5% Nycodenz (Nycomed, Oslo, Norway) gradient. CD103<sup>+</sup> cells were then selected using OX62+MACS microbeads (Miltenyi Biotec) and stained with CD103-Alexa Fluor 647 (Clone

OX62) and CD4-PE mAbs. CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> and CD103<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> cells were sorted using a FACS Aria (BD Biosciences)

**Plasmacytoid DC.** Spleens were perfused with 2mg/mL Collagenase D (Roche) in RPMI 1640/ 1% FCS, chopped into small pieces and incubated 25min at 37°C. EDTA (10mM) was added, and the cell suspension was pipetted up and down for 5min and filtered on 100µm. Cells were washed in PBS/0.5 mM EDTA/2% FCS and mononuclear cells were isolated by centrifugation over Ficoll-Plaque Plus (Amersham, Les Ulis, France). T and partial B cell depletion was then performed by incubating cells with CD8 (OX8), Igκ (OX12), CD45RA (OX33), CD11b/c (OX42), TCRαβ (R7.3) and TCRγδ (V65) mAbs and anti-mouse IgG-coated magnetic beads (DynaL Biotech, Oslo, Norway). After staining with biotinylated 85C7 mAb, cells were incubated with anti-biotin conjugated MACS Microbeads following the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). Positive selection was performed on AutoMACS Separator (Miltenyi Biotec). Cells were then stained with Streptavidine-PerCp Cy5.5, CD4-Alexa Fluor 647 (OX35) and CD45R-PE (HIS24) mAbs. 85C7<sup>+</sup> CD45R<sup>+</sup> CD4<sup>high</sup> and 85C7<sup>+</sup> CD45R<sup>+</sup> CD4<sup>low</sup> cells were sorted on a FACS Aria (BD biosciences). Purity was routinely >99%.

### **Flow cytometry**

Cells were stained using PBS diluted Ab and washed with PBS/0.2% FCS/0.01% Azide. Cells are then acquired on a FACS LSR II (BD biosciences) and results were analyzed with FlowJo software (Version 8, Treestar).

### **Mixed Leucocyte Reaction**

Increasing numbers of allogeneic DC were cultured with 2\*10<sup>4</sup> freshly FACS sorted CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T cells in round-bottom 96-well plates in a final volume of 200µL of RPMI 1640. After 4 days at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, cultures were pulsed for the last 8 hours with 0.5 µCi of [<sup>3</sup>H]TdR (Amersham, Les Ulis, France) per well. The cells were then harvested onto glass fiber filters and [<sup>3</sup>H]TdR incorporation was measured using standard scintillation procedures (Packard Institute, Meriden, CT).

### **Real-Time Quantitative PCR**

Total RNA from 2 x 10<sup>5</sup> to 2 x 10<sup>6</sup> resting or stimulated OX62<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>, OX62<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup>, pDC, 85C7<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> and lymph node cells was extracted using Trizol (Life Technologies, Paisley, U.K.)

and synthesized to cDNA. Real-time quantitative PCR was performed with this cDNA using an Applied Biosystems GenAmp 7700 Sequence Detection System. TaqMan probes sequences used were: rHPRT forward: CCTTGGTCAAGCAGTACAGCC; rHPRT reverse: TTCGCTGATGACACAAACATGA. Total cDNA was amplified in a 25  $\mu$ L reaction PCR mix constituted of 10  $\mu$ L of diluted cDNA, 12.5  $\mu$ L of TaqMan SybrGreen 2x PCR Master Mix (Applied Biosystems, Applied, Courtaboeuf, France) containing AmpliTaq Gold DNA polymerase, dNTPs with dUTP and optimized buffer components, and 0.8  $\mu$ L of 20x TaqMan probes. The reaction started with a step of 2 min at 50°C and 10min at 95°C followed by 40 cycles consisting of 15s at 95°C and 1min at 60°C. Relative expression was calculated using the  $-2^{-\Delta\Delta Ct}$  method and expressed in arbitrary units.

### **Cytokine production**

The amount of cytokine in the supernatants of TLR stimulated cells was measured using Luminex Multiplex technology (BD biosciences) according to the manufacturer's instructions. The amount of soluble IL-12 in the supernatant was measured using a rat ELISA kit (OptEIA; BD PharMingen) according to the manufacturer's instructions.

### **Statistical analysis**

Statistical significance was evaluated using a two-way ANOVA test and a Bonferoni post-test for Luminex results and a one-way ANOVA analysis was performed for IFN $\alpha$  mRNA expression.

## Results

### ***A new monoclonal antibody against rat pDC recognize a CD4<sup>low</sup> population***

Rat pDC are not as studied as in mouse and human model due to the few tools available in rat model. Thus, to further investigate in this way, we generated a monoclonal antibody against rat pDC. The percentage of splenic cells stained by this antibody is similar to the percentage of pDC observed in splenocytes. In addition, the cells stained with this antibody are all CD45R+ and at 95% CD4+ and at 96% Siglech+, a marker of mouse pDC. Thus, this antibody, named 85C7, appeared to be a good tool for the identification of rat pDC.

The newly generated monoclonal antibody 85C7 against rat pDC was then used to sort splenic pDC (Figure 1). Cells were sorted on their 85C7+ CD4<sup>high</sup> CD45R+ phenotype. On this dot plot, among 85C7+ cells, a population CD4<sup>low</sup> CD45R+ was identified, representing 20% of the splenic 85C7+ cells. The identification of this population pointed out the idea of a sub-population of pDC. To confirm or invalidate this hypothesis, 85C7+ CD4<sup>low</sup> cells were sorted to be characterized.

### ***85C7+ CD4<sup>low</sup> cells look like pDC***

First of all, a morphological and phenotypical study was realised on facs sorted pDC and 85C7+ CD4<sup>low</sup> cells. Cells were observed with transmission electronic microscopy (Figure 2A). They both exhibit an eccentric and irregular nucleus, numerous mitochondria and a strongly developed reticulum endoplasmic reminiscent of that observed in plasmocytes. Observed after May Grunwald-Giemsa coloration (Figure 2B), both resting and CpG B matured population show similar aspects with an eccentric nucleus. 85C7 CD4<sup>low</sup> cells are a bit smaller than pDC, what we already observed during FACS sorting of the cells.

85C7+ CD4<sup>low</sup> cells are phenotypically quite similar to pDC. Few markers differentiate them apart from CD4 (Figure 3A). Resting pDC are all CD5, CD161, RT1b positive unlike resting 85C7+ CD4<sup>low</sup> cells which are, contrary to pDC, CD44 and CD90 positive (Table 1). Both population express siglech, a known specific marker of murine pDC (Zhang et al., 2006; Blasius et al., 2006). And their expression of E2-2, a transcriptional factor specific of pDC development (Cisse et al., 2008b), is identical (Figure 3B).

After maturation with CpG B, the expression of the co-stimulation molecules CD40 and CD86 are similar in both populations with a broad expression of CD86 by 85C7 CD4<sup>low</sup> cells (Figure 3C).

pDC represent almost 80% of 85C7<sup>+</sup> splenic cells. Their proportion regarding 85C7<sup>+</sup> CD4<sup>low</sup> cells decrease in mesenteric lymph nodes, thymus and blood to finally represent only 25% of 85C7<sup>+</sup> cells in the bone marrow. 85C7 CD4<sup>low</sup> cells are thus predominant in the bone marrow and the blood (Figure 3D).

### ***Cytokine production of 85C7 CD4<sup>low</sup> cells in response to TLR ligands***

The production of a range of 24 cytokines was assessed in the supernatant of pDC and 85C7 CD4<sup>low</sup> cells after 24h of stimulation with TLR ligands as LPS (TLR4), Loxoribin (TLR7) and CpG B (TLR9) (Figure 4A). No cytokine were produced when pDC and 85C7 CD4<sup>low</sup> cells were stimulated by LPS, a TLR4 ligand. Six cytokines were produced by pDC subsets. GM-CSF is not significantly produced by pDC whatever stimuli was used, unlike 85C7 CD4<sup>low</sup> cells which produced 98 pg/mL  $\pm$  30 pg/mL of GM-CSF in response to TLR7 ligand. The same effect is observed with TNF $\alpha$  where a production by 85C7 CD4<sup>low</sup> cells of 97 pg/mL  $\pm$  20 pg/mL with TLR7 ligand and 80 pg/mL  $\pm$  23 pg/mL with a TLR9 ligand is observed. A poor production of GRO-KC is also observed with TLR7 and 9 ligand in both populations. It is good to notice that 85C7 CD4<sup>low</sup> cells produce a 2 fold higher amount of GRO-KC with both TLR7 and 9 ligand. A two fold higher production of Rantes by 85C7 CD4<sup>low</sup> cells than by pDC is also observed with a 198 pg/mL  $\pm$  60 pg/mL in response to TLR7 ligand and 68 pg/mL  $\pm$  28 pg/mL in response to TLR9 ligand for 85C7 CD4<sup>low</sup> cells. Regarding MIP-1 $\alpha$ , a significant production is detected by both populations. 85C7 CD4<sup>low</sup> cells produced 305 pg/mL  $\pm$  3 pg/mL of MIP-1 $\alpha$  in response to TLR7 ligand and 270 pg/mL  $\pm$  30 pg/mL in response to TLR9 ligand. pDC produced 195 pg/mL  $\pm$  30 pg/mL of MIP -1 $\alpha$  in response to TLR7 ligand and 123 pg/mL  $\pm$  30 pg/mL in response to TLR9 ligand. The most produced cytokine by both subsets is IL-6 as it was previously described. Indeed, in response to TLR7 ligand, pDC produced 14688 pg/mL  $\pm$  6000 pg/mL of IL-6 and 85C7 CD4<sup>low</sup> cells produced 16250 pg/mL  $\pm$  3458 pg/mL. Interestingly, every cytokine produced by both population is always produced in higher level by 85C7 CD4<sup>low</sup>. One cytokine, measured by ELISA, is produced higher in pDC than in 85C7 CD4<sup>low</sup> cells. Indeed, IL-12p40 production by pDC in response to TLR7 is ten fold higher than 85C7 CD4<sup>low</sup> cells with a 22100 pg/mL  $\pm$  7017 pg/mL IL-12p40 production by pDC in response to Loxoribin, TLR7 ligand.

pDC are well known for their enormous production of type 1 IFN in response to TLR7 and 9 ligation. Thus, we assessed the potential of 85C7 CD4<sup>low</sup> cells to produce IFN $\alpha$  in response to CPG A (Figure 4B). After 6h of stimulation, a 310 fold induction of mRNA IFN $\alpha$  is observed in pDC and a 27 fold induction in 85C7 CD4<sup>low</sup> cells. But even if the induction of the IFN $\alpha$  mRNA is lower in 85C7 CD4<sup>low</sup> cells, their level of expression after stimulation is 5 fold higher than the level of IFN $\alpha$  mRNA expressed by stimulated pDC.

### **85C7+ CD4<sup>low</sup> cells are APCs similar to pDC**

The main characteristic of APCs is their capacity to induce naïve T cell proliferation. Thus, we sought to assess the potential of 85C7 CD4<sup>low</sup> cells to induce naïve T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T cells in response to various TLR ligand (Figure 5). After 24h of stimulation with Loxoribin (TLR7), R848 (TLR7 and -8), CpG B (TLR9), 85C7 CD4<sup>low</sup> cells induced a two fold higher proliferation of naïve Teff cells than with pDC. An intermediate proliferation of Teff cells was detected with pDC and 85C7 CD4<sup>low</sup> cells stimulated with PGN (TLR2). pDC and 85C7 CD4<sup>low</sup> cells stimulated with LPS (TLR4) induced only a poor proliferation of naïve Teff cells. These results show that 85C7 CD4<sup>low</sup> cells have a higher power to induce proliferation of naïve Teff cells than pDC.

pDC and 85C7 CD4<sup>low</sup> cells after CpG B stimulation induce the same proliferation of T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg cells (Data not shown).

Moreover, it was previously described that pDC inhibited the suppressive effect of Treg cells on the proliferation of Teff cells. We demonstrated that 85C7 CD4<sup>low</sup> cells, in coculture with Teff cells and Treg cells have exactly the same inhibitory effect after CpG B stimulation than pDC.

## Discussion

In this study we generated the first monoclonal antibody against rat pDC. Indeed, the cells recognized by this antibody are all CD45R+ and 95% of these cells are CD4+ what correspond to pDC phenotype. Moreover, 96% of 85C7+ cells are Siglec-H+ which is a know marker used in mouse to identify pDC (Blasius et al., 2006). This antibody is now currently used in our laboratory for the purification of pDC. When we started using it, among 85C7+ cells, a population CD45R+ CD4<sup>low</sup> was identified. This population was not strain dependent. Indeed, this population was also identified in Sprague-Dawley rat. Two subsets of pDC are already described in mouse distinguished by their expression of CD4 (Yang et al., 2005). Thus, we decided to investigate to discover if this population was a subset of pDC.

85C7 CD4<sup>low</sup> cells have a typical morphology of plasmacytoid dendritic cells with an eccentric nucleus and a strongly developed reticulum endoplasmic reminiscent of that observed in plasmocytes. And they both express an identical level of expression of siglech, a well described marker of mouse pDC (Zhang et al., 2006; Blasius et al., 2006). Moreover, an important clue is that they both pDC and 85C7 CD4<sup>low</sup> cells express E2-2 mRNA, a transcription factor specific of pDC development (Cisse et al., 2008b). These two results are two obvious evidence that both populations surely are pDC. In mouse, subsets of pDC have been described upon their differential expression of CD4 (Yang et al., 2005). Thus, this argument reinforces our hypothesis that 85C7 CD4<sup>low</sup> cells are a pDC subset. They both express low levels of CD40 and CD86, co-stimulatory molecules, at steady state and upregulate these markers after maturation. It strongly suggests that both population are not a different maturation stage of the other. 85C7 CD4<sup>low</sup> cells are more present in the bone marrow and the blood than pDC and reciprocally for pDC in spleen and lymph nodes. This repartition let us think that 85C7 CD4<sup>low</sup> cells could be a hematopoietic precursor of pDC that would evaluate in classically described pDC in periphery. In vitro experiments showed that 85C7 CD4<sup>low</sup> cells in culture never upregulate their expression of CD4. 85C7 CD4<sup>low</sup> cells do not become CD4<sup>high</sup> so they are not the precursors of previously described pDC which express high levels of CD4 at resting state. But pDC, in-vitro, down-regulate their expression of CD4, suggesting they could be the precursors of 85C7 CD4<sup>low</sup> cells. An argument discrediting this theory is that pDC constitutively express TRANCE mRNA and protein at resting and mature state. 85C7 CD4<sup>low</sup> cells do not express TRANCE mRNA and protein at resting state but after

maturation. Thus, pDC can not be the precursor of 85C7 CD4<sup>low</sup> cells. These observations demonstrate that both population are distinct subsets of cells.

Regarding their cytokine production in response to TLR ligand, they produce the same cytokines but in higher amounts. GM-CSF and TNF $\alpha$  are not produced significantly by pDC unlike 85C7 CD4<sup>low</sup> cells in response to TLR7 and -9 ligand. GM-CSF is an hematopoietic factor that stimulates the development of neutrophils (Dang et al., 2006; Atzeni et al., 2002) and macrophages (Caulfield et al., 1997) and promotes the proliferation and development of early erythroid megakaryocytic and eosinophilic progenitor cells. 85C7 CD4<sup>low</sup> cells being predominantly present in the bone marrow, they could play a role in the development of macrophages in viral infectious state, promoting an early antiviral response and the setting of a local inflammatory state with their low production of TNF- $\alpha$ , a pleiotropic pro-inflammatory cytokine, and their high production of IL-6. High IL-6 production is also a characteristic of pDC. This IL-6 production, synergistically with IL-3 produced by T cells and eosinophils, enhance the development of megakaryocytes (Imai et al., 1991), a function that coordinate with the effect of GM-CSF. Some chemokines are also produced higher by 85C7 CD4<sup>low</sup> cells than by pDC. They are GRO-KC, a chemoattractant of neutrophils (Kobayashi, 2006), Rantes, a chemoattractant for memory T cells (Hvas et al., 1997), and MIP-1 $\alpha$ , a chemoattractant for CD8 T cells (Taub et al., 1993). These observations could point out the idea that 85C7 CD4<sup>low</sup> cells could play a role of sentinel in the bone marrow and induce early T cell response to viral infection.

pDC were first described as IFN producing cells because of the enormous amount of IFN $\alpha$  they produce (Rönnblom et al., 1983). 85C7 CD4<sup>low</sup> cells show the same property with a higher expression of IFN $\alpha$  mRNA expression after CpG A stimulation, even if the induction of IFN $\alpha$  mRNA is clearly higher in pDC. This result strengthens that 85C7 CD4<sup>low</sup> cells could be a pDC subset.

pDC are APC that induce the proliferation of naive T cells. This function is a key proof to say that cells are dendritic cells. 85C7 CD4<sup>low</sup> cells have the same abilities than pDC regarding Teff cells and Treg cells stimulation, with a two-fold higher proliferation induction of Teff cells by 85C7 CD4<sup>low</sup> cells. This result correlates with the higher level of cytokines they produce. It was previously described that pDC inhibit the suppression of Teff proliferation by Treg (Ouabed et al., 2008). 85C7 CD4<sup>low</sup> cells have the same effect.

All these evidence clearly demonstrate that 85C7 CD4<sup>low</sup> cells are pDC which specific function still remain to be determined. Thus, a new nomenclature of rat pDC should be

defined. In fact, previously described 85C7+ CD45R+ CD4high pDC should be named CD4high pDC and 85C7+ CD45R+ CD4low cells should be named CD4low pDC. CD4low pDC could play an important antiviral role in the bone marrow or in the blood as sentinels and CD4high pDC be their counterparts in secondary lymphoid organs.

## References

- Asselin-Paturel, C., et Trinchieri, G. (2005). Production of type I interferons: plasmacytoid dendritic cells and beyond. *J Exp Med* 202, 461-5.
- Atzeni, F., Schena, M., Ongari, A. M., Carrabba, M., Bonara, P., Minonzio, F., et Capsoni, F. (2002). Induction of CD69 activation molecule on human neutrophils by GM-CSF, IFN-gamma, and IFN-alpha. *Cell. Immunol* 220, 20-29.
- Banchereau, J., et Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-52.
- Blasius, A. L., Cella, M., Maldonado, J., Takai, T., et Colonna, M. (2006). Siglec-H is an IPC-specific receptor that modulates type I IFN secretion through DAP12. *Blood* 107, 2474-2476.
- Caulfield, J. J., Hawrylowicz, C. M., Kemeny, D. M., et Lee, T. H. (1997). GM-CSF increases the ability of cultured macrophages to support autologous CD4+ T-cell proliferation in response to *Dermatophagoides pteronyssinus* and PPD antigen. *Immunology* 92, 123-130.
- Cisse, B., Caton, M. L., Lehner, M., Maeda, T., Scheu, S., Locksley, R., Holmberg, D., Zweier, C., den Hollander, N. S., Kant, S. G., et al. (2008). Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell* 135, 37-48.
- Dang, P. M., Stensballe, A., Boussetta, T., Raad, H., Dewas, C., Kroviarski, Y., Hayem, G., Jensen, O. N., Gougerot-Pocidallo, M., et El-Benna, J. (2006). A specific p47phox -serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *J. Clin. Invest* 116, 2033-2043.
- 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.
- Hvas, J., McLean, C., Justesen, J., Kannourakis, G., Steinman, L., Oksenberg, J. R., et Bernard, C. C. (1997). Perivascular T cells express the pro-inflammatory chemokine RANTES mRNA in multiple sclerosis lesions. *Scand. J. Immunol* 46, 195-203.
- Imai, T., Koike, K., Kubo, T., Kikuchi, T., Amano, Y., Takagi, M., Okumura, N., et Nakahata, T. (1991). Interleukin-6 supports human megakaryocytic proliferation and differentiation in

vitro. *Blood* 78, 1969-1974.

Ju, X., Clark, G., et Hart, D. N. J. (2010). Review of human DC subtypes. *Methods Mol. Biol* 595, 3-20.

Kobayashi, Y. (2006). Neutrophil infiltration and chemokines. *Crit. Rev. Immunol* 26, 307-316.

Liu, Y. (2005). IPC: Professional Type 1 Interferon-Producing Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 275-306.

Matsui, T., Connolly, J. E., Michnevitz, M., Chaussabel, D., Yu, C., Glaser, C., Tindle, S., Pypaert, M., Freitas, H., Piqueras, B., et al. (2009). CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions. *J. Immunol* 182, 6815-6823.

Ouabed, A., Hubert, F. X., 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, 5862-70.

Pulendran, B. (2004). Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors. *Immunol. Rev* 199, 227-250.

Rönblom, L., Ramstedt, U., et Alm, G. V. (1983). Properties of human natural interferon-producing cells stimulated by tumor cell lines. *Eur. J. Immunol* 13, 471-476.

Schwab, N., Zozulya, A. L., Kieseier, B. C., Toyka, K. V., et Wiendl, H. (2010). An imbalance of two functionally and phenotypically different subsets of plasmacytoid dendritic cells characterizes the dysfunctional immune regulation in multiple sclerosis. *J. Immunol* 184, 5368-5374.

Shortman, K., et Liu, Y. J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2, 151-61.

Taub, D. D., Conlon, K., Lloyd, A. R., Oppenheim, J. J., et Kelvin, D. J. (1993). Preferential migration of activated CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science* 260, 355-358.

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.

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.

Yang, G., Lian, Z., Kikuchi, K., Liu, Y., Ansari, A. A., Ikehara, S., et Gershwin, M. E. (2005). CD4-plasmacytoid dendritic cells (pDCs) migrate in lymph nodes by CpG inoculation and

represent a potent functional subset of pDCs. *J. Immunol* 174, 3197-3203.

Zhang, J., Raper, A., Sugita, N., Hingorani, R., Salio, M., Palmowski, M. J., Cerundolo, V., et Crocker, P. R. (2006). Characterization of Siglec-H as a novel endocytic receptor expressed on murine plasmacytoid dendritic cell precursors. *Blood* 107, 3600-3608.

## Figures legend

### Figure 1: Facs sorting of CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>-</sup> spleen pDCs

After a positive selection of 85C7<sup>+</sup> cells with anti-biotin Microbeads (Miltenyi Biotec), cells were stained with Streptavidine - PerCp Cy 5.5, PE anti-CD45R and AlexaFluor 647 anti-CD4 mAbs. Among the 85C7<sup>+</sup> cells, CD45R<sup>+</sup> CD4<sup>high</sup> and CD45R<sup>+</sup> CD4<sup>low</sup> cells were sorted on Facs Aria. Purity was routinely >99,5% for both population.

### Figure 2: Morphological analysis of CD4<sup>high</sup> and CD4<sup>low</sup> pDC

(A) Typical morphology of CD4<sup>high</sup> pDC (left) and CD4<sup>low</sup> pDC (right) from Lewis rat as shown by transmission electron microscopy (left, X12000; right, X10000). (B) Cytospins of freshly sorted CD4<sup>high</sup> pDC (a) and CD4<sup>low</sup> pDC (b) or after 24h hours of culture in presence of CpG B for CD4<sup>high</sup> (c) and CD4<sup>low</sup> (d) pDC were stained with May-Grünwald-Giemsa. X630.

### Figure 3: Phenotype and repartition of pDC subsets

(A) 85C7<sup>+</sup> spleen cells were double stained with AlexaFluor 647 anti-CD4 mAb and various FITC mAbs. (B) Expression of E2-2 mRNA on freshly sorted DC and freshly prepared LN. (C) Expression of maturation markers by CD4<sup>high</sup> pDC (a) and CD4<sup>low</sup> pDC (b) after 24h of culture with CpG B. (D) Repartition in percentage of CD4<sup>high</sup> and CD4<sup>low</sup> pDC in various lymphoid organs in a healthy Lewis rat. The results are expressed as the mean  $\pm$ SD of three independent experiments.

### Figure 4: Cytokine production by splenic pDC subsets

(A) Freshly sorted splenic pDC subsets (30 000 cells) were cultured in 200 $\mu$ L of complete RPMI 1640 medium/10% FCS, in 96-well plates at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> with addition of LPS (1 $\mu$ g/mL), Loxoribine (100 $\mu$ g/mL) or CpG B (5 $\mu$ M). After 24h of culture, supernatants were collected and a range of 24 cytokines were measured using Luminex Multiplex technology (BD biosciences). Only significantly measured cytokines are represented. (B) The expression of IFN $\alpha$  mRNA was assessed in total mRNA prepared from FACS-sorted spleen pDC subsets and after 6 hours of culture in the presence of CpG A (5 $\mu$ M) by real-time quantitative PCR. The results are

expressed as a ratio of IFN $\alpha$  to HPRT mRNA expression. Results are the mean  $\pm$  SD of three experiments. \*, p < 0,05 and \*\*, p < 0,01

**Figure 5: Induction of proliferation of T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> by CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>-</sup> pDC**

Freshly sorted CD4<sup>high</sup> (upper) and CD4<sup>low</sup> (lower) pDC (Lewis) were stimulated 24h with various TLR ligands and then incubated in round-bottom, 96-well plates with freshly facs sorted CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T cells (SpD). After 4 days at 37°C, culture are pulsed with [<sup>3</sup>H]TdR for the last 8h. Proliferation was then assessed using standard scintillation procedures. The results are expressed as the mean  $\pm$  SD of the triplicates of three independent experiments.

**Table 1: Phenotype of resting pDC subsets**

Fresh spleen cells were triple stained with AlexaFluor 647-conjugated 85C7, PE-conjugated CD4 (OX35) mAb and FITC-conjugated mAbs listed in the left column. -,  $\pm$ , +, ++, +++ represent the relative staining intensity on gated 85C7<sup>+</sup> CD4<sup>high</sup> or CD4<sup>low</sup> cells as compared with the isotype control (arbitrary units). S represents a spray staining.

Figure 1

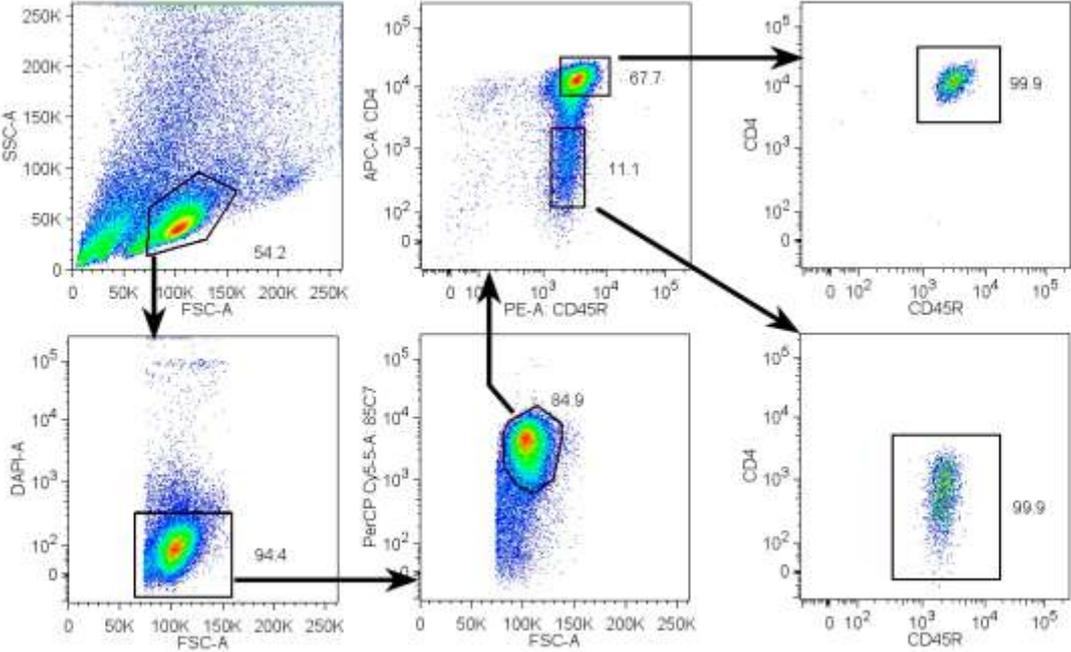
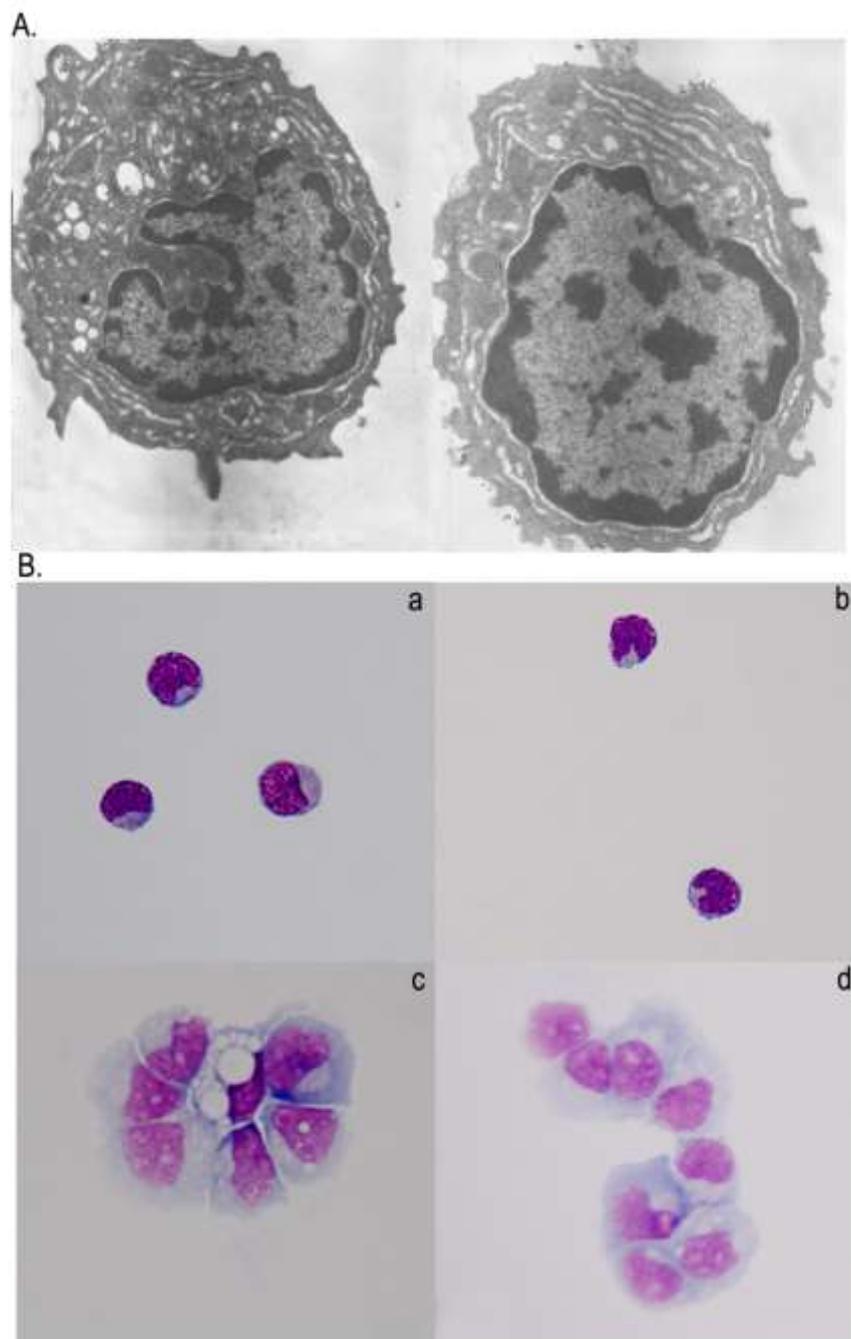
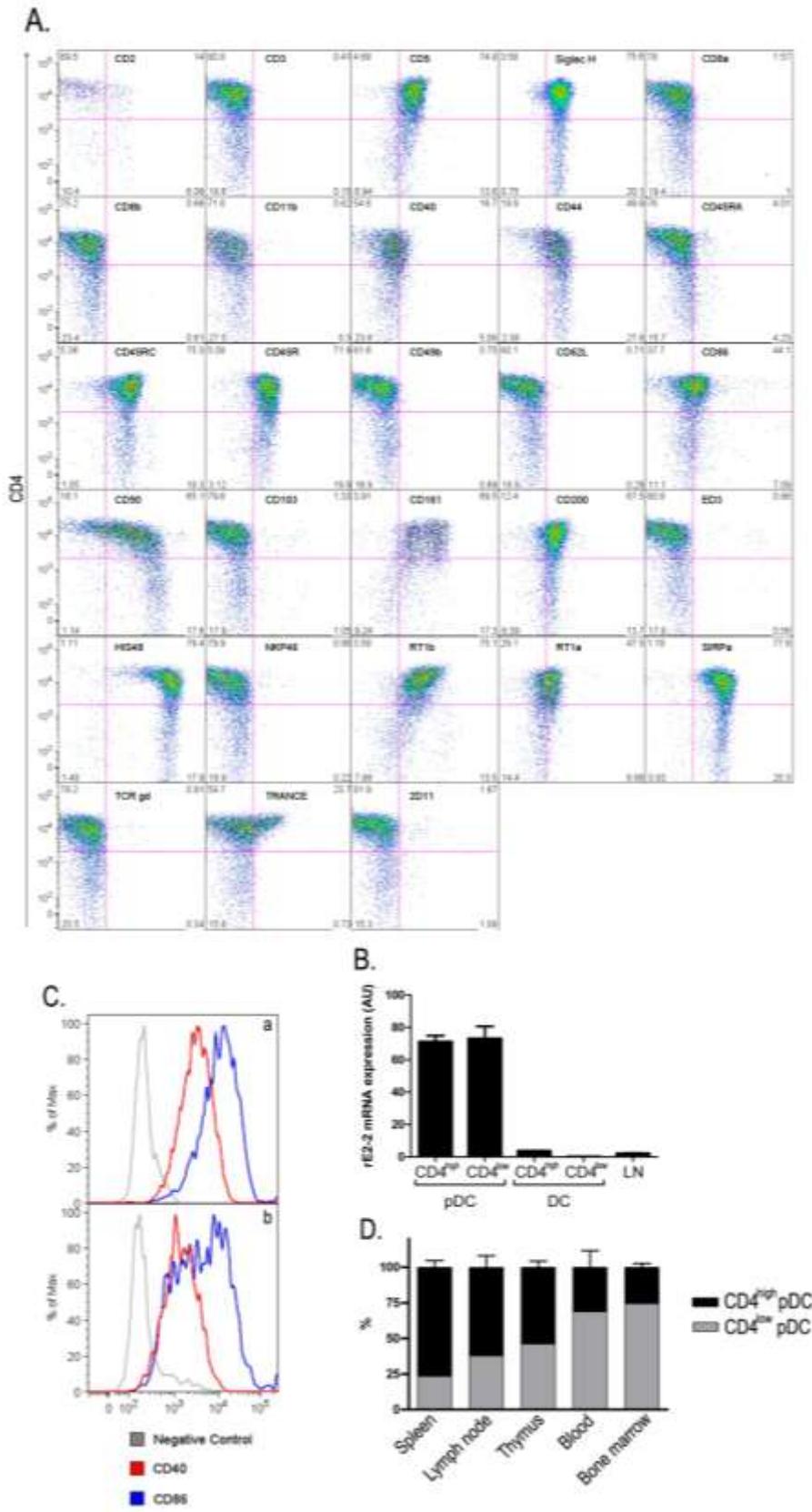


Figure 2



**Figure 3**



**Figure 4**

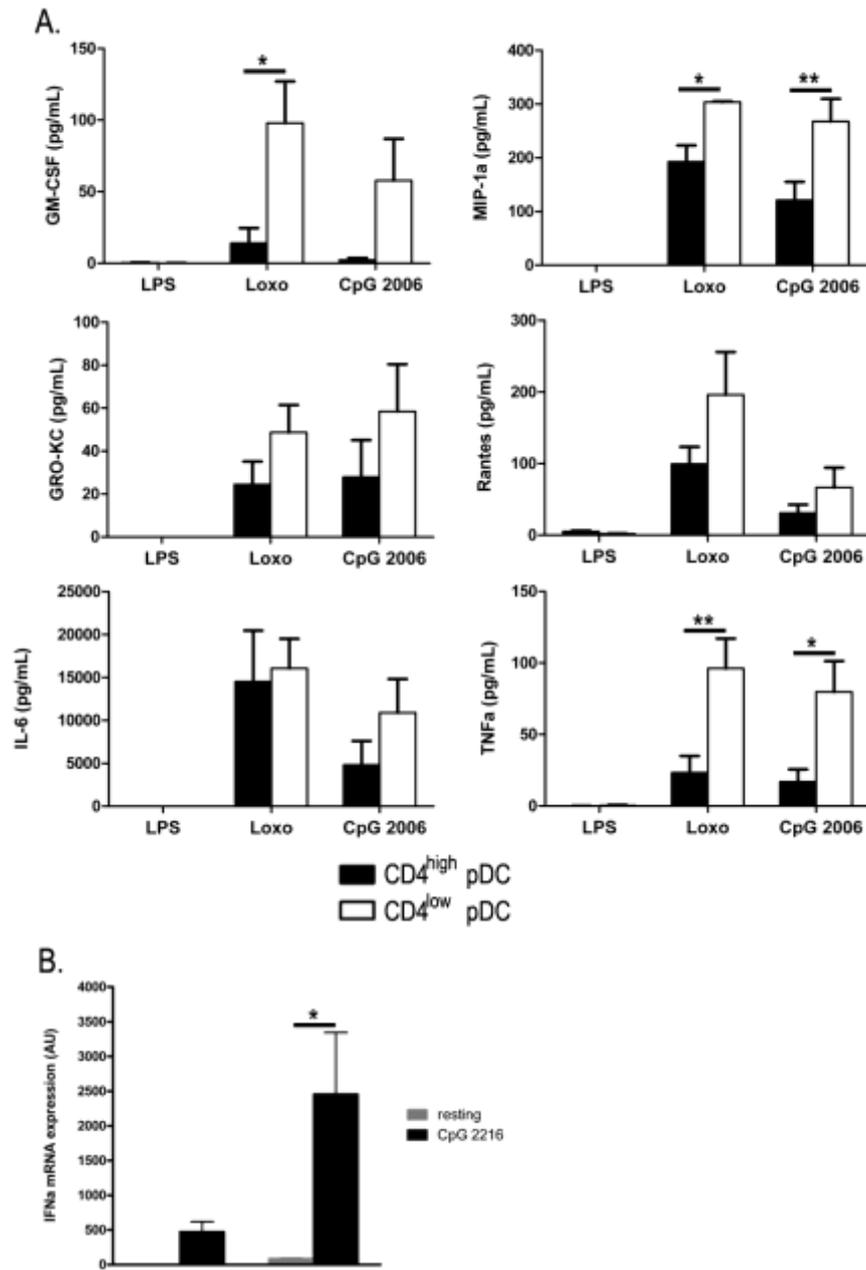


Figure 5

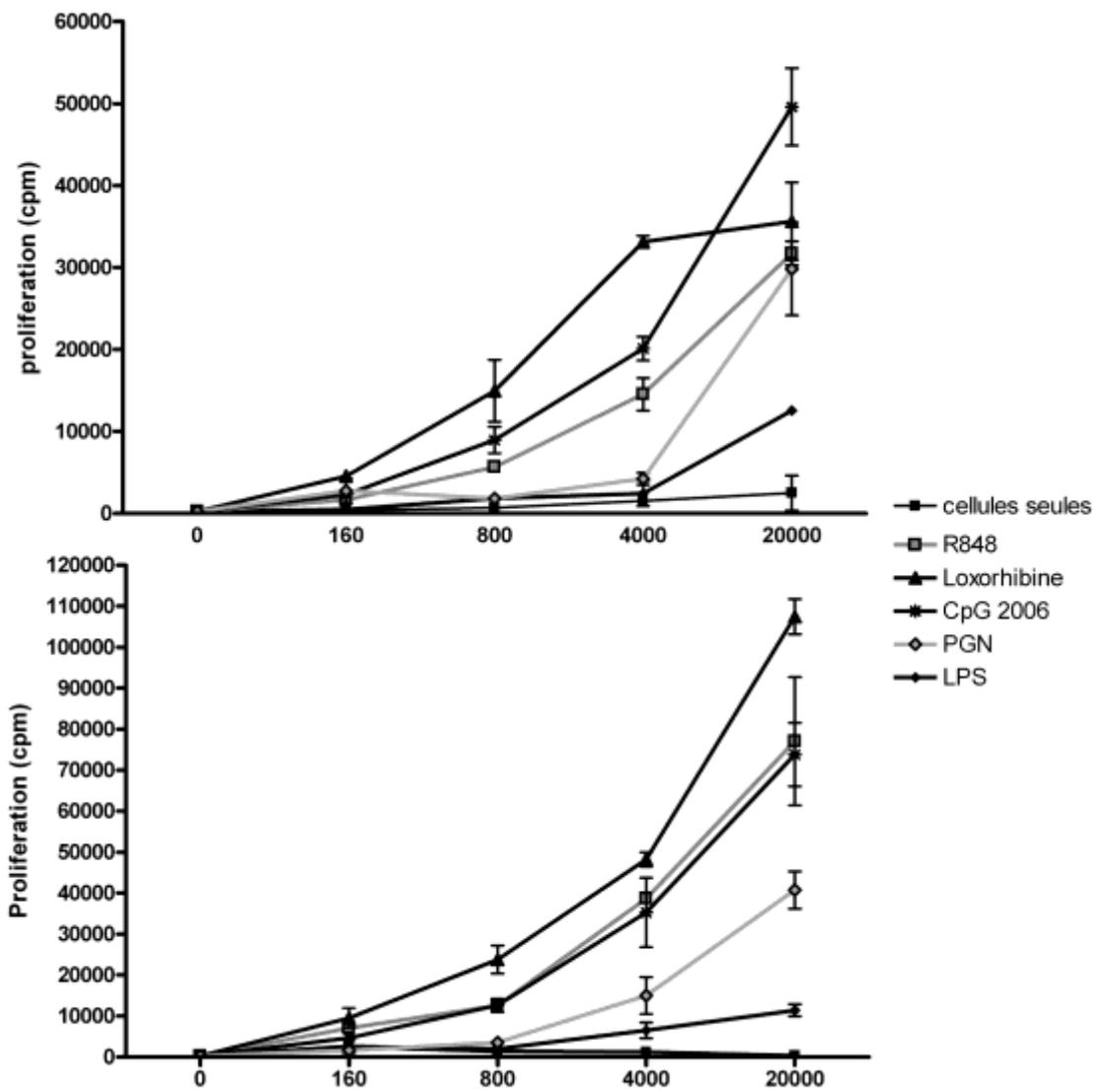


Table 1

	CD4 <sup>high</sup> pDC	CD4 <sup>low</sup> pDC
2D11	-	-
CD2	+/-	+/-
CD3	-	-
CD5	+	+/-
CD8a	-	-
CD8b	-	-
CD40	+/-	+/-
CD44	+/-	+
CD45R	+	+
CD45RA	-	+/-
CD45RC	+	+
CD49b	-	-
CD62L	-	-
CD86	+/-	+/-
CD90	S	+++
CD103	-	-
CD11b	-	-
CD161	+	+/-
CD200	+	+
ED3	-	-
HIS48	+++	+++
MARM4	+/-	-
NKP46	-	-
RT1a	+/-	+/-
RT1b	+	+/-
Siglec H	+	+
SIRPa	++	++
TCRgd	-	-
TRANCE	+/-	-

## Résultats complémentaires

### Génération d'un Ac monoclonal anti-pDC de rat

Il est apparu nécessaire de générer un Ac anti-pDC de rat afin de faciliter leur étude et leur purification. Des souris femelles Balb/c ont donc été immunisées avec des pDC fraîchement extraites de la rate et triées par cytofluorométrie selon leur expression des marqueurs CD45R et CD4. Les souris sont immunisées avec  $1,5$  à  $2 \times 10^6$  pDC et  $10 \mu\text{g}$  de CpG 1668 injectés dans la voute plantaire en sous-cutané à J0, J4 et J7. A J8, les ganglions poplités sont prélevés et les cellules des ganglions sont fusionnées avec les cellules du myélome Sp2/O selon le protocole classique décrit dans le "Current Protocol in Immunology" (Chapitre 2 Section II : Production of Antibodies; Current protocol in Immunology, John Wiley & Wiley Sons, Inc). Les hybridomes obtenus ont ensuite été testés par cytofluorométrie de flux selon deux critères : Marquage inférieur à 5% des splénocytes totaux et spécificité pour les cellules CD4<sup>high</sup>. Un seul hybridome d'intérêt a été retenu : le 85C7. Cet Ac marque également une population de cellules CD45R<sup>+</sup> CD4<sup>low</sup> qui a tout d'abord été supposé comme étant des pDC activées. En effet, il avait été observé que les pDC sous-exprimaient le CD4 après maturation.

Il a également été vérifié si cet Ac avait un effet sur la fonction des pDC. Pour cela, il a été purifié des pDC selon leur expression du CD4 et de CD45R par FACS Aria. Ces cellules ont ensuite été cultivées en présence de différentes doses de l'Ac 85C7 (de 0 à  $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) avec ou sans activation apr du CpG 2006 à  $10 \mu\text{m}/\text{mL}$ . Il en est ressorti que l'Ac n'avait aucun effet sur la survie ou la maturation des pDC. L'Ac 85C7 n'a également aucune influence sur la production d'IL-12p40, IL-6 et TNF- $\alpha$  par les pDC.

### Phénotype des cellules 85C7+

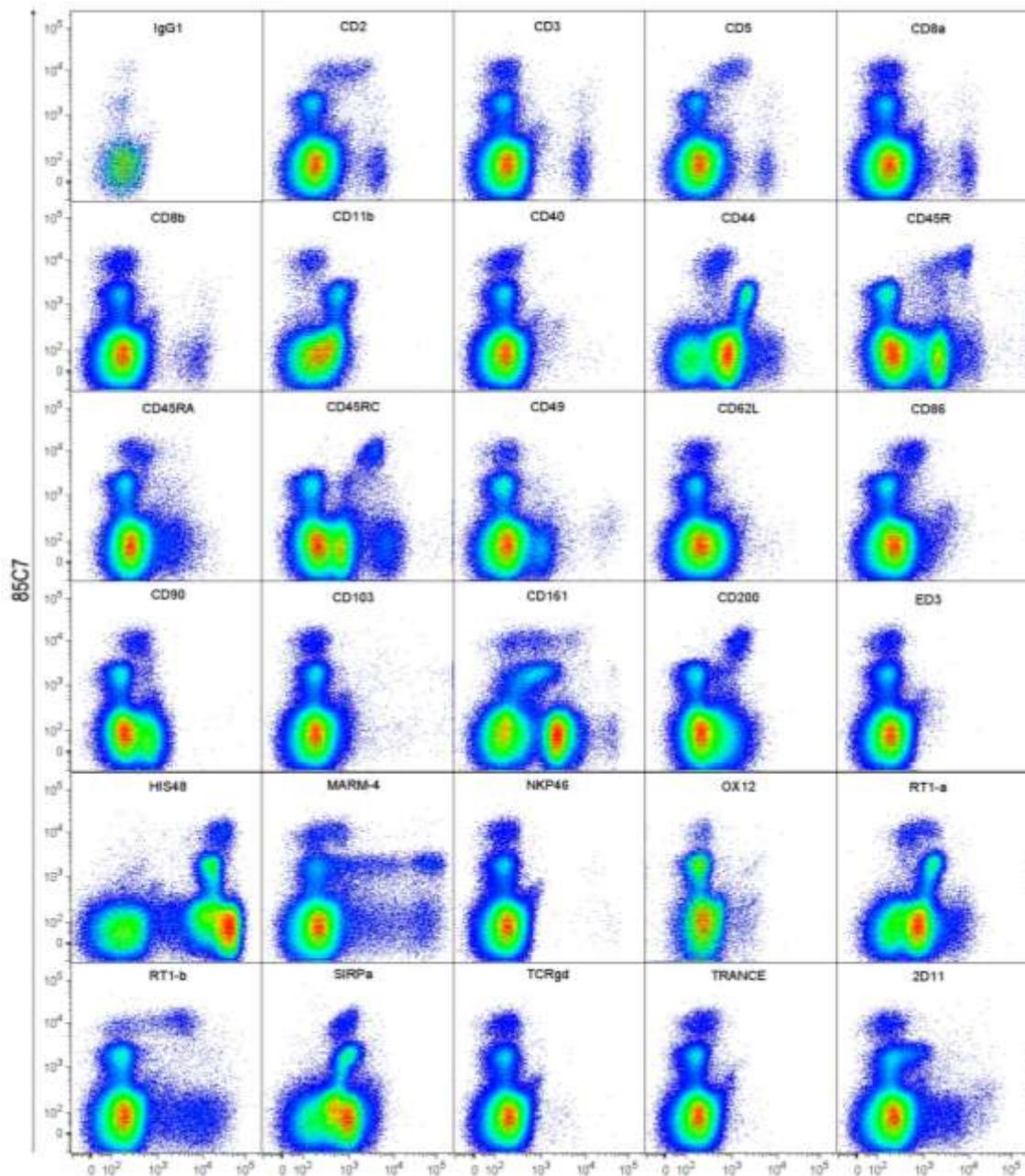
Afin de mieux caractériser les cellules 85C7+, nous avons réalisé un phénotype complet de ces cellules à partir de splénocytes, où la population de pDC CD4<sup>high</sup> est majoritaire et également à partir de cellules de la moelle osseuse, où la population de pDC CD4<sup>low</sup> est majoritaire. Nous avons à la fois regardé le phénotype des cellules 85C7+ et aussi plus précisément le phénotype des 2 populations de pDC afin de mieux comprendre la spécificité de cet Ac et le phénotype des cellules qu'il reconnaît.

A partir de splénocytes totaux et de prélèvement de moelle osseuse, les cellules sont marquées avec l'Ac 85C7 biotinylé puis révélé avec une streptavidine-AlexaFluor 647. Les

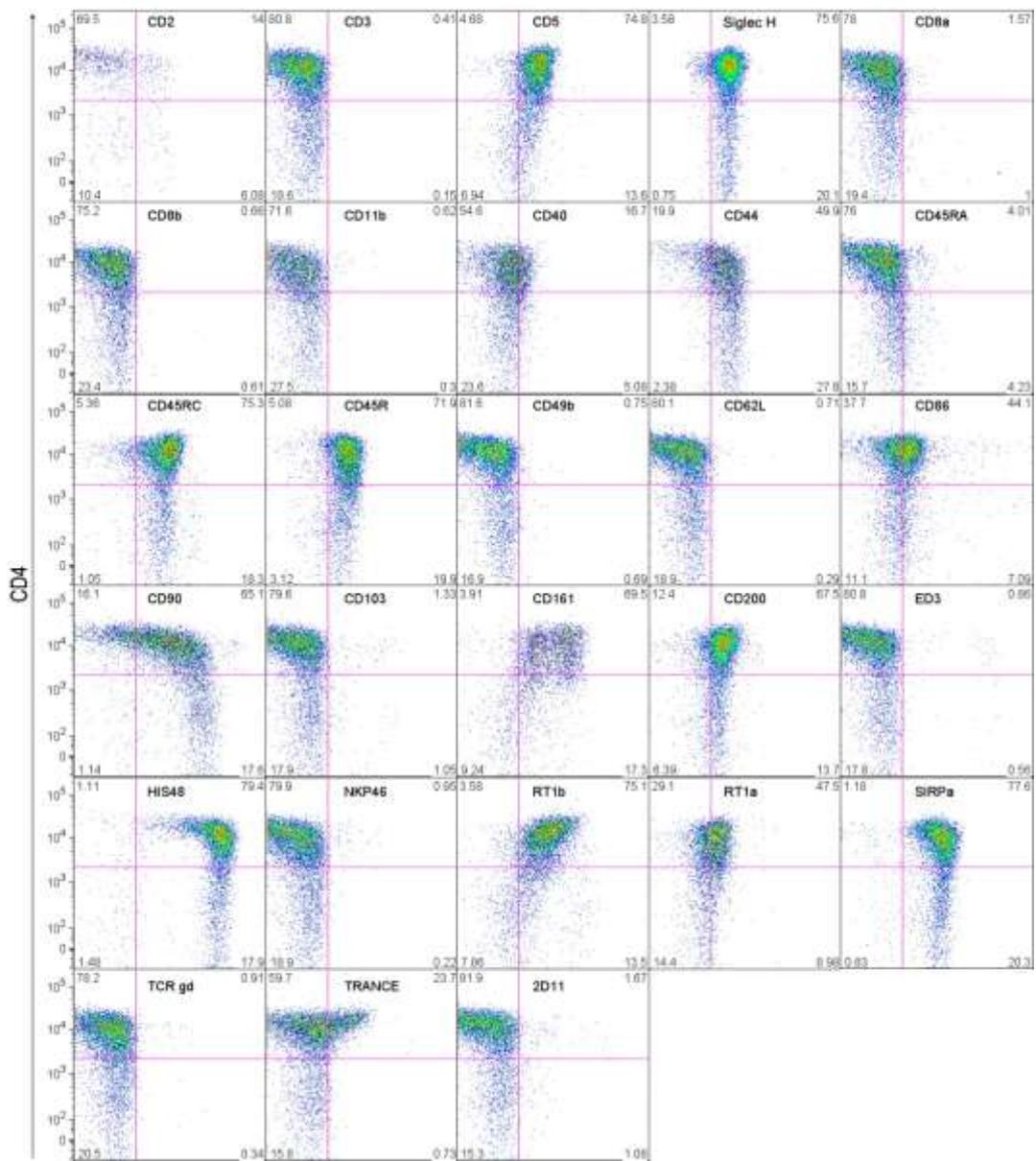
cellules sont ensuite marquées avec différents Ac couvrant un large éventail de marqueurs de surface. Les résultats concernant les splénocytes ont été décrits dans l'article 1.

Les résultats ont permis d'observer que l'Ac 85C7 reconnaît une population fortement positive, correspondant aux pDC, mais également une population intermédiaire ayant un phénotype distinct. En effet, on peut voir sur les différents Dot Plot qu'elles n'expriment pas les mêmes marqueurs et avec des intensités d'expression différentes. On observe par exemple, Figure 17A, que les pDC, 85C7<sup>high</sup>, de la moelle osseuse n'expriment pas MARM-4 (IgM), alors qu'une partie de la population 85C7<sup>int</sup> apparaît fortement IgM+, suggérant fortement qu'il s'agisse de lymphocytes B. Concernant l'expression du CMH II, celle-ci est négative sur les cellules 85C7<sup>int</sup>, alors qu'une population majoritaire des cellules 85C7<sup>high</sup> est positive. Ceci est vrai aussi bien pour les splénocytes que pour les cellules de la moelle osseuse. Ces deux populations de cellules 85C7<sup>high</sup> et 85C7<sup>low</sup> se distinguent aussi par l'expression de certains marqueurs comme CD2, CD5, CD11b, CD44, CD45R, CD45RC et CD200.

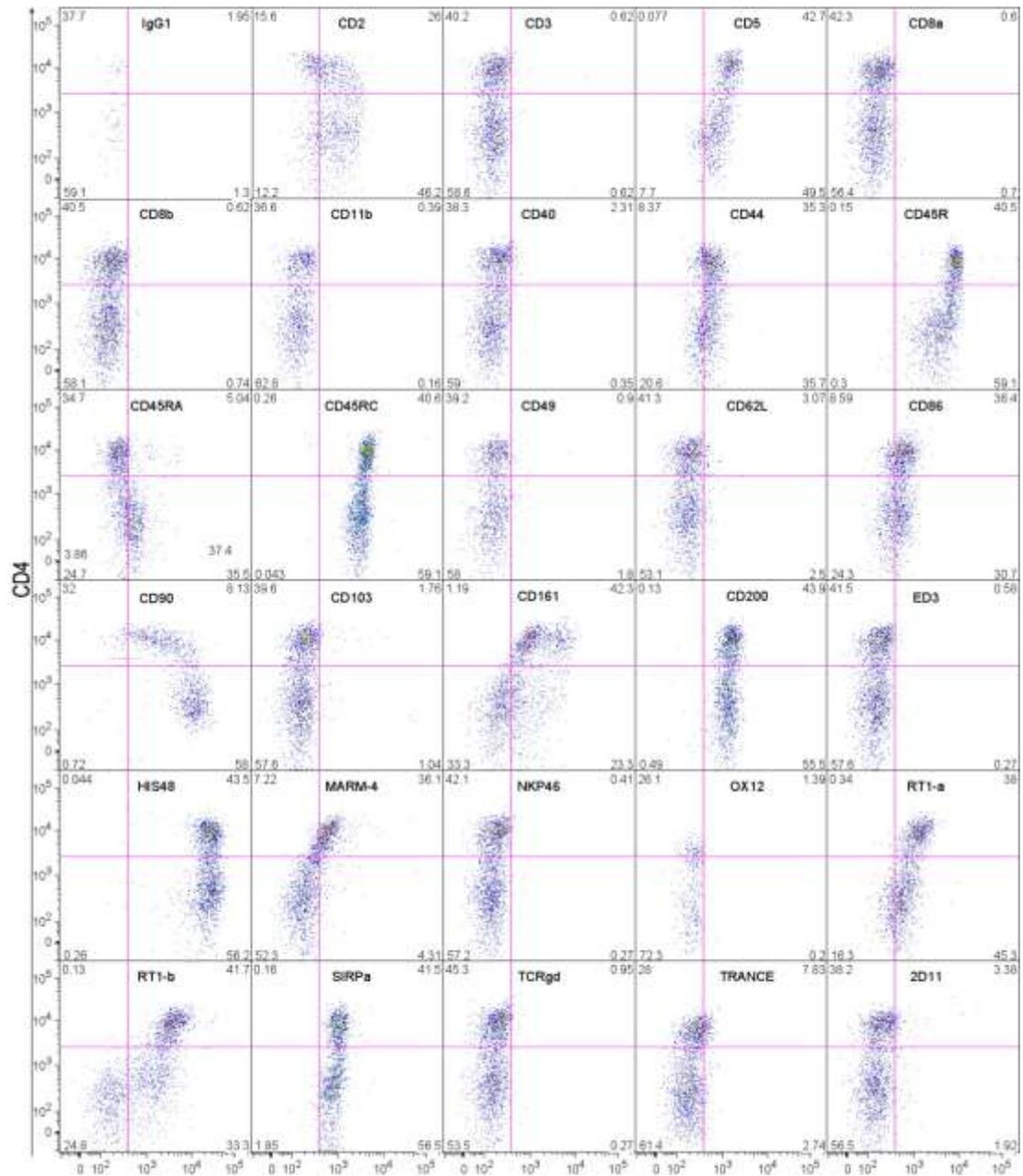
Plus en détail, les deux populations de pDC CD4<sup>high</sup> et CD4<sup>low</sup>, isolées de la rate, diffèrent pour leur expression membranaire de certains marqueurs comme CD5, CD90, CD161, RT1b, MARM-4 et TRANCE (cf. Article 1)(Figure 17B). Le phénotype des deux populations de pDC isolées de la moelle osseuse est peu différent. En effet, les deux populations de pDC y diffèrent également pour les marqueurs CD90, CD161, MARM-4, RT1a, RT1b et plus faiblement pour CD5 et TRANCE (Figure 17D).



**Figure 17A - Phénotype des cellules 85C7+ de la moelle osseuse.** Analyse par cytométrie en flux du phénotype des cellules de la moelle osseuse en fonction de leur expression du 85C7.



**Figure 17B. Phénotype des cellules 85C7+ CD4+/- spléniques.** Analyse par cytométrie en flux du phénotype des cellules spléniques 85C7+ en fonction de leur expression du CD4.

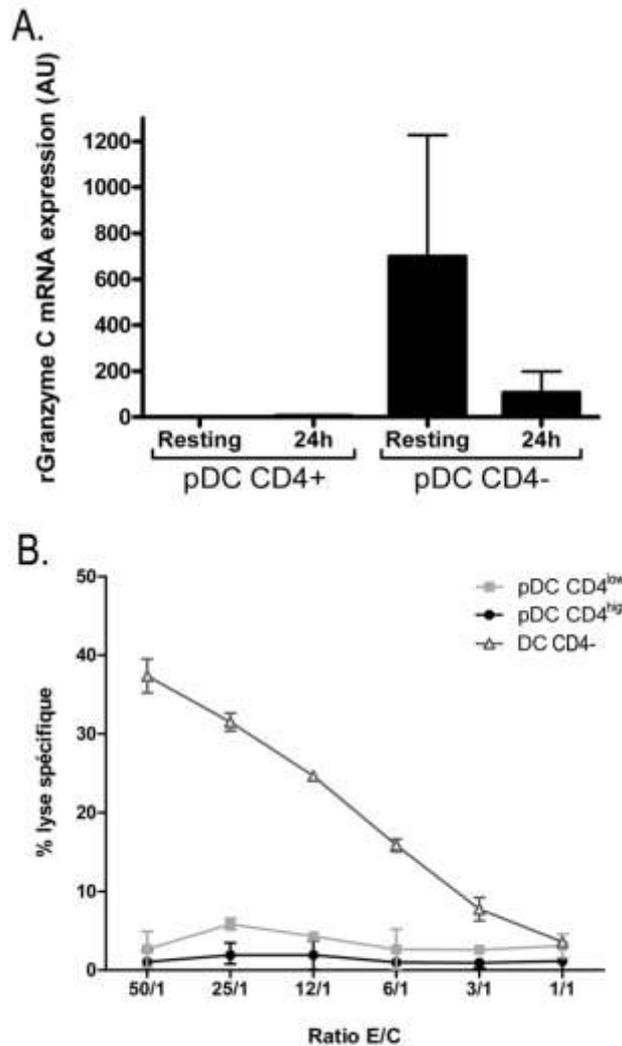


**Figure 17C. Phénotype des cellules 85C7+ CD4<sup>±</sup> de la moelle osseuse.** Analyse par cytométrie en flux du phénotype des cellules de la moelle osseuse 85C7+ en fonction de leur expression du CD4

### Test de la cytotoxicité des populations de pDC

Après la publication chez l'homme de résultats décrivant deux populations de pDC dont une aurait des propriétés cytotoxiques (Matsui et al., 2009), nous avons observé, dans les résultats de puces à ADNc (Résultats - Partie 2), que les pDC CD4<sup>low</sup> exprimaient, au repos, un gène codant une granzyme que les pDC CD4<sup>high</sup> n'exprimaient pas (Granzyme C) (Figure 18A). Nous nous sommes donc interrogés sur le potentiel rôle cytotoxique des pDC CD4<sup>low</sup>. Un test de cytotoxicité a donc été réalisé en utilisant comme cible des Yac, cellules de

lymphomes T murins. Les deux populations de pDC fraîches ont été incubées à différentes quantités en présence de 1500 cellules Yac préincubées avec du  $^{51}\text{Chrom}$ e. La quantité de Chrome relargué, correspondant au nombre de cellules lysées, est ensuite mesuré par comptage. Les DC  $\text{CD4}^-$  ayant été décrite comme cytotoxique vis-à-vis des cellules Yac (Trinite et al., 2000), elles sont utilisées comme contrôle positif. On peut voir que les deux populations de pDC n'ont pas d'effet cytotoxique sur les cellules Yac (Figure 18B). Le rôle de l'expression du Granzyme C reste donc à être déterminé.



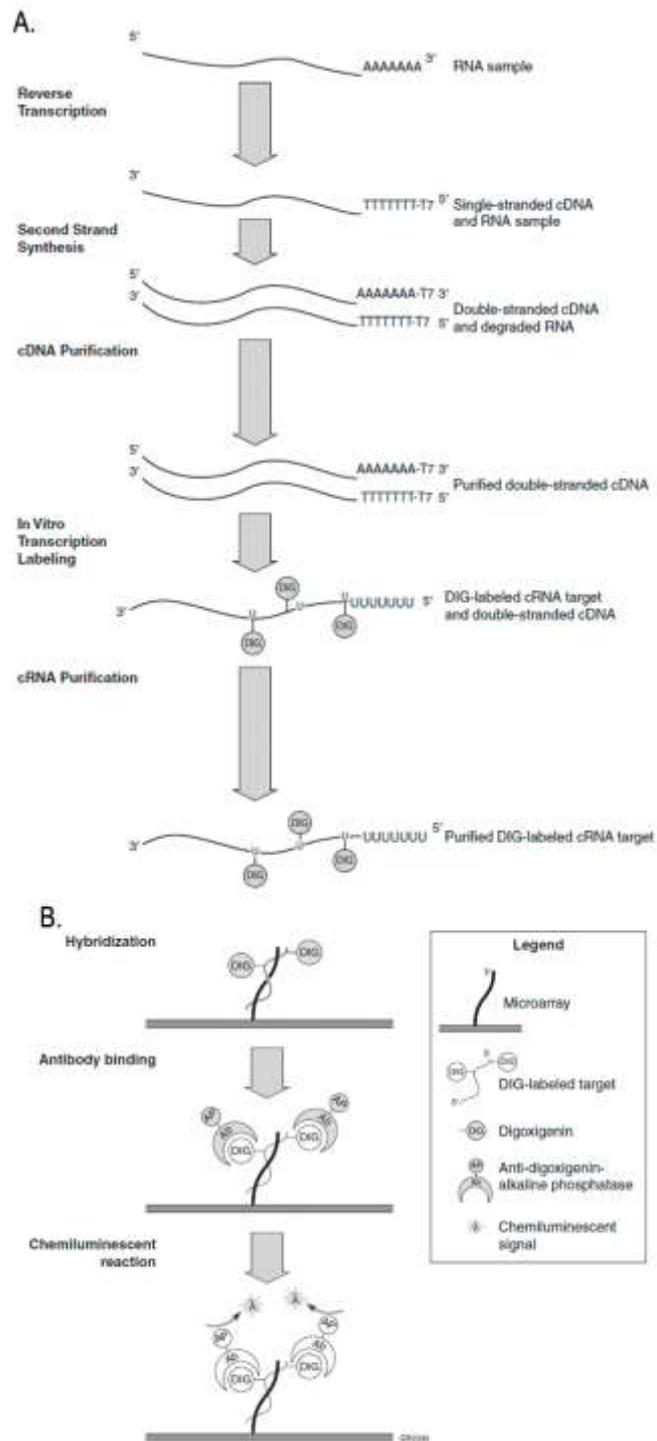
**Figure 18 - Etude de la cytotoxicité des populations de pDC.** A. Expression de l'ARNm de Granzyme C sur les populations de pDC. B. Cytotoxicité des DC sur les cellules Yac.

## **IV. Analyse du transcriptome des sous-populations de pDC chez le rat par puces à ADNc**

Afin de mieux caractériser les gènes spécifiquement exprimés par les deux populations de pDC et permettre d'identifier des fonctions spécifiques à chacune des deux populations, l'analyse du transcriptome des pDC CD4<sup>high</sup> et CD4<sup>low</sup> fraîches ou après 24h d'activation en présence de CpG B a été réalisé.

### **Réalisation des puces à ADN**

Les puces pangénomiques de rat (Applied Biosystems, Foster City, CA) (P/N 4337467) se composent de 26857 oligonucléotides de 60 paires de bases recouvrant 27088 gènes de rat. Les ARN totaux de pDC CD4<sup>high</sup> et CD4<sup>low</sup> fraîches ou après 24h d'activation en présence d'oligonucléotides CpG 2006 (CpG B) sont extraits avec du trizol. 500ng de ces ARN sont convertis en ARNc marqués avec à la digoxigénine (DIG) en utilisant le kit "NanoAmp RT-IVT Labeling kit" d'Applied Biosystems suivant le protocole du fournisseur (Figure 19A). Puis ces ARNc sont hybridés sur les puces et révélés par le kit "Chemiluminescence Detection kit" d'Applied Biosystems suivant le protocole du fournisseur (Figure 19B). Les puces sont ensuite lues sur un lecteur de puces chimioluminescent AB1700 (Applied Biosystems).

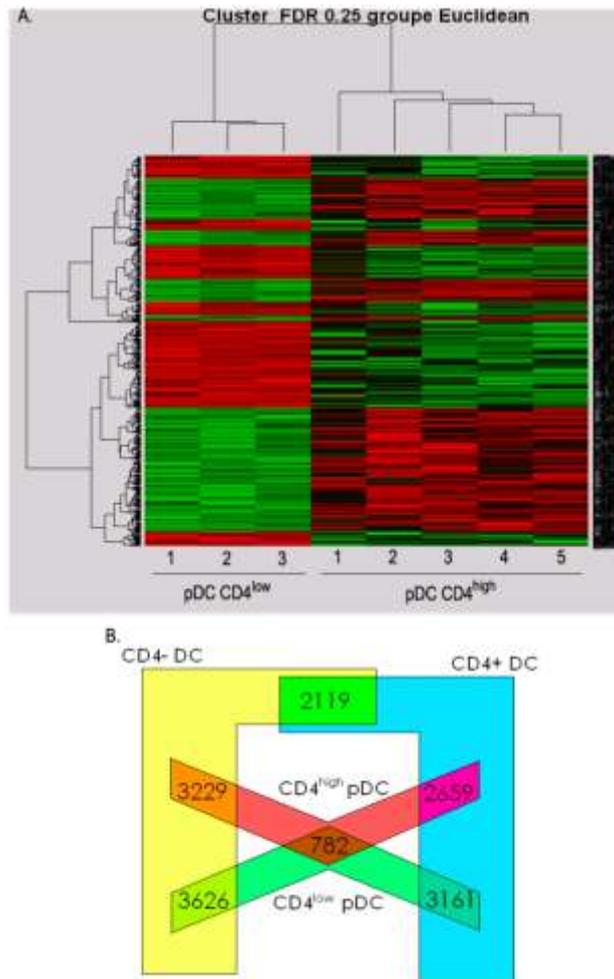


**Figure 19 – Protocole des puces à ADNc.** A. Protocole de marquage des ARNc à la digoxygénine. B. Protocole d'hybridation et de révélation des puces à ADNc. D'après Applied Biosystems NanoAmp RT-IVT Labeling Kit protocol

Les résultats ont ensuite été analysés grâce au logiciel R (GNU) qui permet d'obtenir une liste de gènes différentiellement exprimés entre deux populations. Cela donne une visualisation en clustering par lien de parenté des différents gènes. En vert seraient

représentés les gènes sous-exprimés alors qu'en rouge seraient représentés les gènes surexprimés dans une population par rapport à l'autre (Figure 20A).

Une analyse par le logiciel Genespring (Agilent Technologies) a également été réalisée. Genespring permet de comparer plusieurs populations en même temps. Nous avons donc analysés les deux populations de pDC avec les deux populations de cDC (DC CD4+ et DC CD4-) sur lesquels des puces identiques avaient été précédemment réalisées (Camille Chauvin). Pour effectuer cette analyse, les valeurs sont triées selon deux filtres qui éliminent les signaux trop proches du bruit de fond et trop diffusés dans un groupe de puces. Puis des tests statistiques d'analyses de variances (ANOVA) suivis d'un test post-hoc Tukey HSD. Les gènes statistiquement significatifs ( $p < 0,05$ ) ont été analysés. Ces gènes sont surexprimés ou sous-exprimés dans une des populations par rapport à l'autre (Figure 20B). On peut voir que les deux populations de pDC ont un nombre de gènes différentiellement exprimé plus limité que toutes les autres populations de DC entre elles. Cela conforte bien les nombreuses similarités phénotypiques et fonctionnelles que l'on a observées.



**Figure 20 - Analyse des puces à ADNc.** A. Analyse des résultats de puces par le logiciel R représenté en clustering. B. Nombre de gènes différentiellement exprimés entre les différentes populations de DC chez le rat par le logiciel Genespring.

## Gènes d'intérêt potentiel

Pour sélectionner des gènes d'intérêt potentiel par le biais de ces puces à ADNc, nous avons tout d'abord regardé les gènes spécifiquement exprimés par une seule des populations. En effet, ces gènes spécifiquement exprimés par une population cellulaire constituent des marqueurs de cette population pouvant permettre de définir des fonctions particulières de cette population. Nous avons ensuite sélectionné des gènes dont l'expression était fortement réduite après activation ou bien au contraire fortement induite après activation. Parmi les gènes spécifiquement exprimé par l'une ou l'autre des populations de pDC, nous avons sélectionné différents gènes suivant leur fonction et leur originalité. Ces gènes sont: CD3 $\gamma$ , CD8 $\beta$ , CD209 $\alpha$ , EPCR (Endothelial protein C receptor), Granzyme C, Pygm

(Phosphorylase, glycogène, muscle), Reeline, Robo-1 (Rodent Bone-1), TRANCE (TNF-related activation-induced cytokine), VLDLR (Very low density lipoprotein receptor).

Les gènes CD3 $\gamma$  et CD8 $\beta$  sont des gènes spécifiques d'une chaîne du complexe CD3 et du co-récepteur au TCR CD8 qui sont normalement exclusivement exprimés pas les LT.

CD209a, aussi nommé SIGNR5 et mouse DC-SIGN, est une protéine transmembranaire de type II portant un domaine récepteur aux lectines de type C. C'est un homologue de la protéine DC-SIGN humaine. Si DC-SIGN humain est une des lectines de type C les plus étudiées, l'expression et la fonction de CD209a n'a pu être étudié en profondeur dû au manque de bons Ac spécifiques.

EPCR, récepteur endothéliale de la protéine C activée, est exprimé dans l'endothélium des gros vaisseaux sanguins et joue un rôle dans la régulation des fonctions anti-coagulantes, anti-inflammatoires et anti-apoptotiques.

Granzyme C est une sérine protéase localisé dans des granules dans les LT cytotoxiques et les cellules NK. Il induit la lyse de la cellule cible en attaquant les mitochondries et le noyau.

Le gène Pygm code une phosphorylase à glycogène du muscle qui assure l'entrée du glycogène stocké dans la glycolyse, assurant ainsi la production d'énergie nécessaire au muscle. Ce gène nous a paru intéressant car il pourrait expliquer d'où provient la grande quantité d'énergie nécessaire aux pDC pour effectuer leur énorme production d'IFN $\alpha$ .

La Reeline est une protéine de la matrice extracellulaire qui joue un rôle dans la formation des dendrites des neurones et dans la migration neurale. Ses récepteurs sont ApoER2, VLDLR et des récepteurs neuronaux associés à la cadhérine. Cette protéine est sous-exprimée chez les patients atteints de schizophrénie et de désordre bipolaire.

Le gène Robo-1 (Rodent Bone-1) est un membre de la famille des récepteurs de l'activateur du plasminogène type urokinase/CD59/Ly-6/toxine de serpent. Il est exprimé abondamment dans l'os et serait impliqué dans le remodelage osseux. Ce gène n'a été décrit qu'une seule fois chez le rat (Noel et al., 1998).

TRANCE, que j'ai présenté en introduction, a lui aussi été identifié dans les puces à ADNc.

Enfin, le gène VLDLR codant une protéine impliqué dans le métabolisme des lipides. Mais de manière intéressante, VLDLR est un récepteur de la Reeline qui est aussi ressorti de l'analyse des puces à ADNc.

La première étape a tout d'abord été la validation des résultats de puces à ADNc par PCR quantitative en temps réel. Nous avons donc construit différentes amorces (noté r pour rat suivi du nom du gène) pour confirmer les différences d'expression des gènes d'intérêt dans les populations de DC chez le rat sur des échantillons différents de ceux utilisés pour les puces. Nous avons également vérifié cette expression chez la souris (amorce nommée par m pour mouse puis le nom du gène) où l'on dispose de plus nombreux outils pour étudier la fonction in-vitro et in-vivo des gènes qui nous intéresse (Tableau 9).

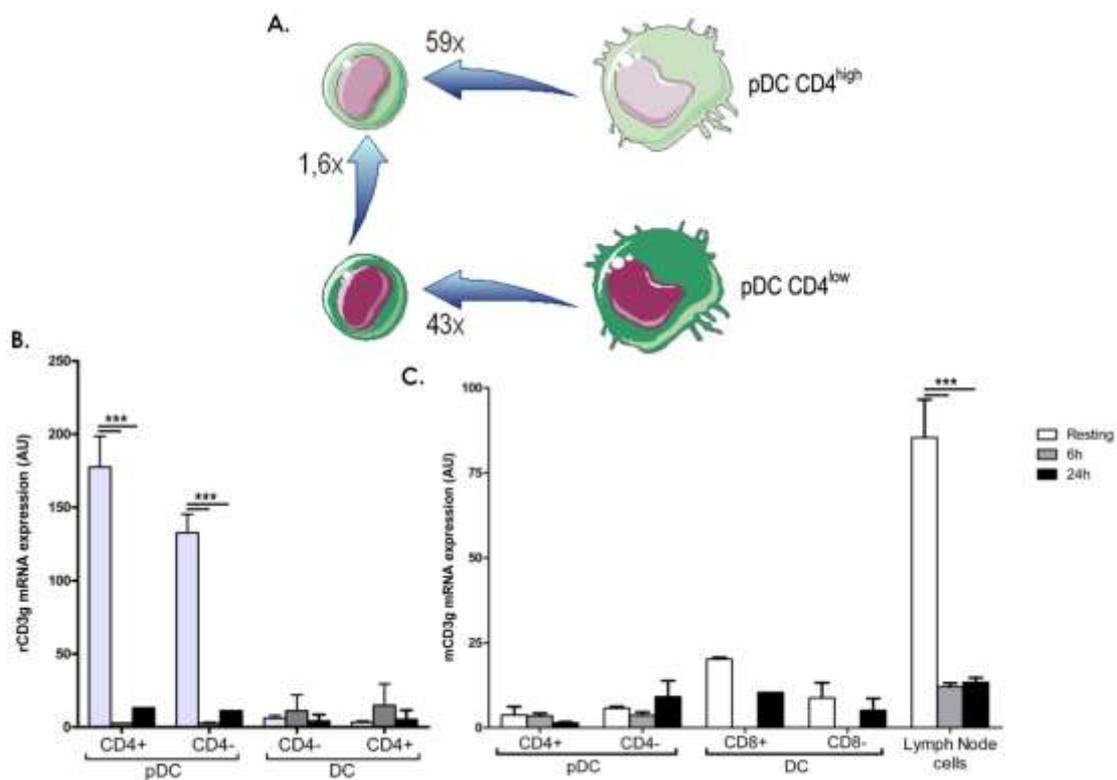
**Tableau 9 - Séquence des amorces de gènes d'intérêt potentiel des puces à ADNc**

Nom	Séquence 5' - 3'	taille
mCD3g Lo	GTCCCGCAATGAGATATACACC	22
mCD3g Up	CAAGGAGCAAAGGAGACATCAA	22
mCD8b Lo	GCTCTCCTCCGCACACAGTA	20
mCD8b Up	GCCTTACCACCCTCAGCCT	19
mEPCR Lo	ACCAGCGATTATGAAACAGCC	21
mEPCR Up	CAAACATGAAAGGGAGCCAA	21
mPygm Lo	ATGGTGCCGATGGTCAGAG	19
mPygm Up	ACCGCCTCCGAGTGATCTT	19
mReeline Lo	CAGTAGAGGTGGAAGGATGGGT	22
mReeline Up	AACTGGTGGACACTTTCGATGA	22
mTRANCE Lo	AGAATTGCCCGACCAGTTTT	20
mTRANCE Up	CACACCTCACCATCAATGCTG	21
mVLDLR Lo	CAGATGGGAGGAAGAAAGGAGA	22
mVLDLR Up	GAAGACCACTGAAGAGGACCTGT	23
rCD209a Lo	AGAGCCACAACCACTAACC	23
rCD209a Up	TGCCTCCACAGTCCCAA	21
rCD3g Lo	GGTTTCCTTGGAGACGGCT	19
rCD3g Up	TTTTCTCCTTGCTGTTGGTGT	22
rCD8b Lo	AGGGTACAAAAGCCACAGGG	20
rCD8b Up	GCTGTCTGCCTGAAGTCTG	20
rEPCR Lo	ACCTCCTCATATCCCTCCTCA	22
rEPCR Up	ACGGCGTTGCTAATTTTCTC	21
rGranzC Lo	GGTATCTTCCCCAGCCAG	20
rGranzC Up	CCACCCTGCCTATAATCCTGA	21
rPygm Lo	CCATCCGTGTCCACTCTCTTG	21
rPygm Up	AATGCCCAGGAATACTACGACC	22
rReeline Lo	TCACAATTTCCACGGACGC	19
rReeline Up	ACCCATGAAGAATCCAAGTTTGT	23
rRobo-1 Lo	ATGATGGCAGGGAGCACAG	19
rRobo-1 Up	GCCCCCACTCAGGTACTC	19
rSlc11a1 Lo	TCAGAATGGGCAGCACAGC	19
rSlc11a1 Up	CGTCTTCTCACTCGCTCTTG	21
rTRANCE Lo	AGCCACGAACCTTCCATCAT	20
rTRANCE Up	CAGAATATCAGAAGACAGCACGC	23
rVLDLR Lo	CGGAGTAGGGTGTATGGGTG	21
rVLDLR up	GTGGAGGAATTGGCAACATAAA	22

### CD3 $\gamma$ :

Le gène codant la chaîne gamma du CD3 apparaît dans les puces comme nettement surexprimé dans les populations de pDC fraîches (59 fois pour les pDC CD4<sup>high</sup> et 43 fois pour

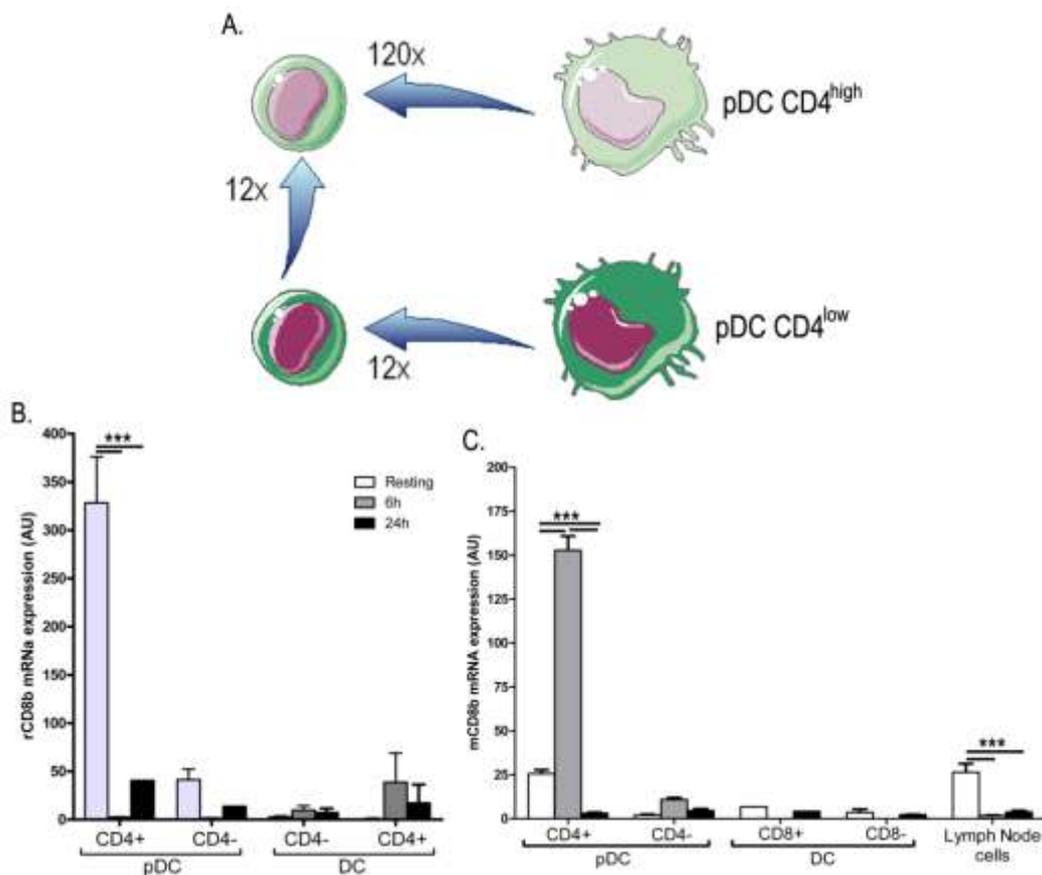
les pDC CD4<sup>low</sup>) par rapport aux pDC après maturation par CpG B. Ce gène apparaît également légèrement plus exprimé dans les pDC CD4<sup>high</sup> par rapport aux pDC CD4<sup>low</sup> (Figure 21A). Ces résultats sont confirmés par les résultats obtenus par PCR quantitative comme le montre la Figure 21B. En effet, on peut voir que dès 6h de maturation en présence de CpG B, l'expression de l'ARNm CD3 $\gamma$  devient quasiment nulle, ceci pour les deux populations de pDC. Concernant les DC CD4<sup>+</sup> et CD4<sup>-</sup>, l'expression de l'ARNm CD3 $\gamma$  reste faible qu'elles soient fraîches ou matures. Chez la souris les résultats sont différents. En effet les populations de pDC CD4<sup>+</sup> et CD4<sup>-</sup> ne montrent pas d'expression de l'ARNm CD3 $\gamma$ . Une légère expression est observée pour les DC CD8<sup>+</sup> fraîches mais elle n'apparaît pas significative. La seule expression significative de l'ARNm CD3 $\gamma$  est observée dans les cellules ganglionnaires fraîches (Figure 21C) qui étaient utilisées comme contrôle positif.



**Figure 21 - Validation des résultats de puces à ADN obtenus pour le gène CD3 $\gamma$ .** (A) Différence d'expression du gène codant CD3 $\gamma$  entre les pDC CD4<sup>high</sup> et CD4<sup>low</sup> fraîchement triées ou après maturation 24h en présence de CpG B. (B) Expression de l'ARNm CD3 $\gamma$  dans les populations de DC fraîchement triées ou après maturation 6h ou 24h en présence de CpG B chez le rat. (C) Expression de l'ARNm CD3 $\gamma$  dans les populations de DC fraîchement triées ou après maturation 6h ou 24h en présence de CpG B chez la souris ainsi que dans les cellules ganglionnaires fraîchement préparée ou après activation 6h ou 24h en présence de Concanavale A. \*\*\*,  $p < 0.001$

## CD8 $\beta$ :

L'expression de l'ARNm CD8 $\beta$  apparaît dans les puces à ADNc comme fortement surexprimé (120 fois) dans les pDC CD4<sup>high</sup> fraîches comparée aux matures. Cette expression est également surexprimée dans les pDC CD4<sup>low</sup> fraîches (12 fois) comparées aux matures. De plus, les pDC CD4<sup>high</sup> semblent l'exprimer douze fois plus que les CD4<sup>low</sup> fraîches (Figure 22A). En PCR quantitative sur les différentes populations de DC chez le rat à différents état d'activation, la seule expression significative et également importante de l'ARNm CD8 $\beta$  est observée par les pDC CD4<sup>high</sup> fraîches (Figure 22B). Ce résultat confirme la forte surexpression observée dans les puces à ADN par les pDC CD4<sup>high</sup> fraîches. Chez la souris, nous avons également retrouvé une forte expression de l'ARNm CD8 $\beta$  dans les pDC CD4<sup>+</sup> mais après 6 heures de maturation en présence de CpG B. Les pDC CD4<sup>+</sup> fraîches de souris expriment, quant à elles, l'ARNm CD8 $\beta$  à un niveau assez faible mais néanmoins supérieur à toutes les autres DC. Un niveau d'expression similaire est observé dans les cellules ganglionnaires fraîches (Figure 22C).

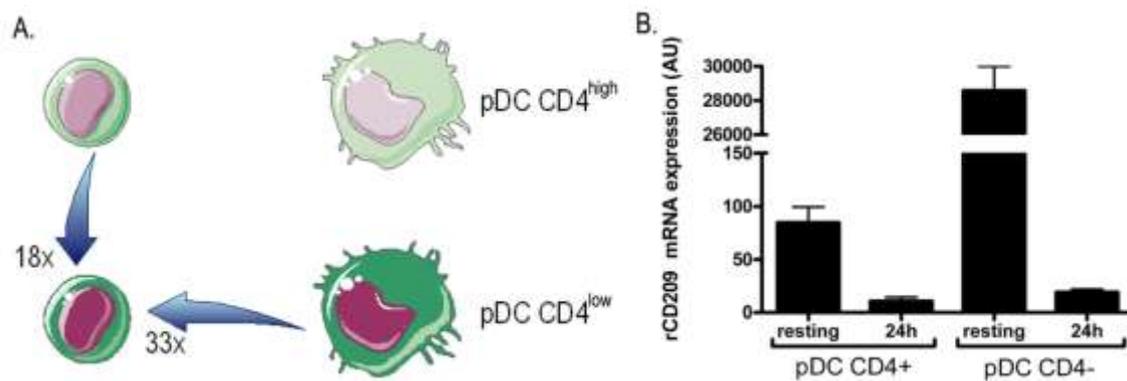


**Figure 22 - Validation des résultats de puces à ADNc obtenus pour le gène CD8 $\beta$ .** (A) Différence d'expression du gène codant CD8 $\beta$  entre les pDC CD4<sup>high</sup> et CD4<sup>low</sup> fraîchement triées ou après maturation 24h en présence de CpG B. (B) Expression de l'ARNm CD8 $\beta$  dans les populations de DC fraîchement triées ou après maturation 6h ou 24h en présence de CpG B chez le rat. (C) Expression

de l'ARNm CD8 $\beta$  dans les populations de DC fraîchement triées ou après maturation 6h ou 24h en présence de CpG B chez la souris ainsi que dans les cellules ganglionnaires fraîchement préparée ou après activation 6h ou 24h en présence de Concanavaline A. \*\*\*, p < 0.001

### CD209a :

Le gène CD209a, dans les résultats de puces à ADNc, apparaît comme principalement exprimé par les pDC CD4<sup>low</sup> fraîches. En effet, elles l'expriment 18 fois plus que les pDC CD4<sup>high</sup> fraîches et 33 fois plus qu'à après maturation (Figure 23A). Après vérification de ces résultats par PCR quantitative, on observe une diminution de l'expression de l'ARNm CD209a après maturation des deux populations de pDC. L'expression de CD209a par les pDC CD4<sup>low</sup> fraîches reste néanmoins très importante quantitativement (Figure 23B). Il reste maintenant à analyser l'expression de l'ARNm CD209a dans les populations de cDC chez le rat et aussi dans les différentes populations de DC chez la souris.

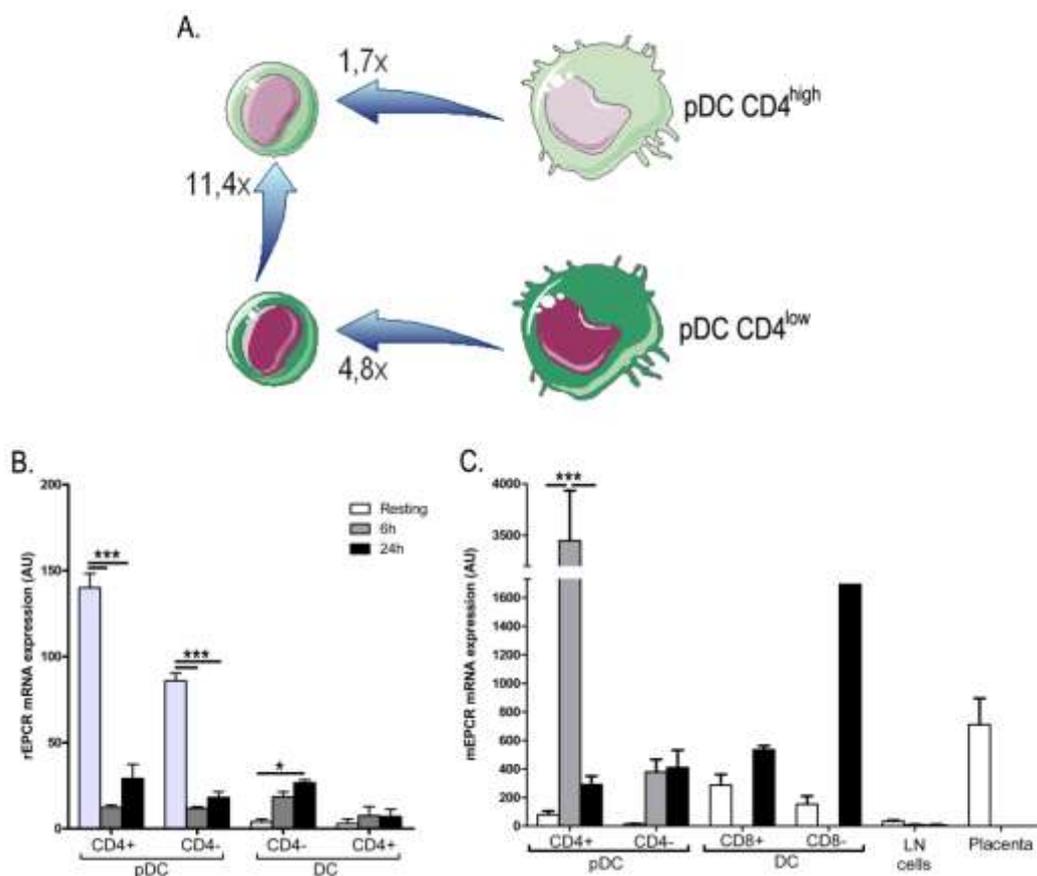


**Figure 23 - Validation des résultats de puces à ADNc obtenus pour le gène CD209a.** Différence d'expression du gène codant CD209a entre les pDC CD4<sup>high</sup> et CD4<sup>low</sup> fraîchement triées ou après maturation 24h en présence de CpG B. (B) Expression de l'ARNm CD209a dans les populations de pDC fraîchement triées ou après maturation 24h en présence de CpG B chez le rat.

### EPCR :

L'analyse des résultats de puces à ADNc a révélé une expression légèrement plus importante du gène EPCR par les deux populations de pDC fraîches par rapport aux matures. Cette expression est par ailleurs environ onze fois supérieure dans les pDC CD4<sup>high</sup> comparée aux pDC CD4<sup>low</sup> (Figure 24A). Cette différence apparaît moins importante après vérification des résultats par PCR quantitative. En effet, l'expression de l'ARNm EPCR par PCR quantitative est à peine deux fois plus importante dans les pDC CD4<sup>high</sup> fraîches comparées aux pDC CD4<sup>low</sup> fraîches. Les différences d'expression observées dans les résultats de puces sont toutefois très semblables en PCR quantitative. Aucune expression significative de l'ARNm

EPCR n'a été retrouvée dans les cDC fraîches et matures. On peut néanmoins noter que pour les DC CD4-, l'expression de l'ARNm EPCR semble légèrement augmentée au cours de la maturation (Figure 24B). Chez la souris le profil d'expression est différent. En effet les pDC CD4+ fraîches n'expriment que très faiblement l'ARNm EPCR. Cette expression est en revanche très fortement augmentée après 6 heures de maturation pour ensuite rechuter après 24 heures de maturation. Pour les pDC CD4-, l'expression de l'ARNm EPCR dans les cellules fraîches est quasiment nulle. Elle est significativement augmentée après 6h de maturation et le reste après 24h. Les DC CD8+ semblent exprimer constitutivement un niveau basal d'EPCR non négligeable. Quant aux DC CD8-, l'expression de l'ARNm EPCR est fortement augmentée après maturation en présence de CpG B. Les cellules ganglionnaires de souris, quelque soit leur état d'activation, n'expriment pas EPCR. Des résultats de puces à ADN public ayant montrés que le placenta exprimait EPCR, nous l'avons utilisé comme contrôle positif. Effectivement, il est exprimé fortement dans ce tissu (Figure 24C).

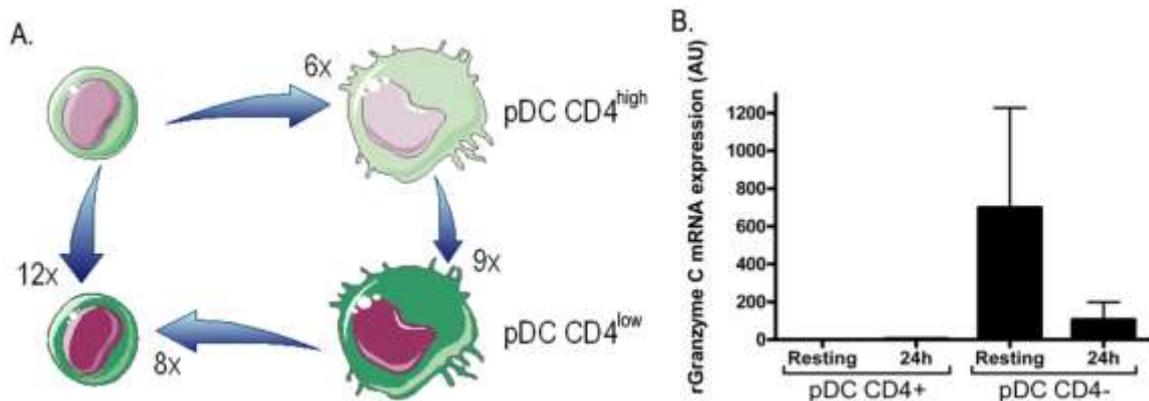


**Figure 24 - Validation des résultats obtenus par puces à ADNc pour le gène EPCR.** (A) Différence d'expression du gène codant EPCR entre les pDC CD4<sup>high</sup> et CD4<sup>low</sup> fraîchement triées ou après maturation 24h en présence de CpG B. (B) Expression de l'ARNm EPCR dans les populations de DC fraîchement triées ou après maturation 6h ou 24h en présence de CpG B chez le rat. (C) Expression de l'ARNm EPCR dans les populations de DC fraîchement triées ou après maturation 6h ou 24h en présence de CpG B chez la souris, dans les cellules ganglionnaires fraîchement préparée ou après

activation 6h ou 24h en présence de Concanavalline A, ainsi que dans une préparation de cellules placentaire fraîche. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$

### Granzyme C :

Après analyse des résultats de puces à ADNc, la régulation du gène du Granzyme C apparaît différente dans les deux populations de pDC. En effet, il est surexprimé après maturation pour les pDC CD4<sup>high</sup> et down-régulé pour les pDC CD4<sup>low</sup>. Mais que ce soit à l'état frais ou mûré, il est plus exprimé dans les pDC CD4<sup>low</sup> (Figure 25A). Après vérification par PCR quantitative, ces résultats sont bien confirmés, avec une différence plus prononcée entre les deux populations. L'expression de l'ARNm du Granzyme C apparaît toutefois très faible dans les pDC CD4<sup>high</sup> (Figure 25B). Il faut désormais étudier cette expression dans les populations de cDC chez le rat et dans les différentes populations de DC chez la souris.

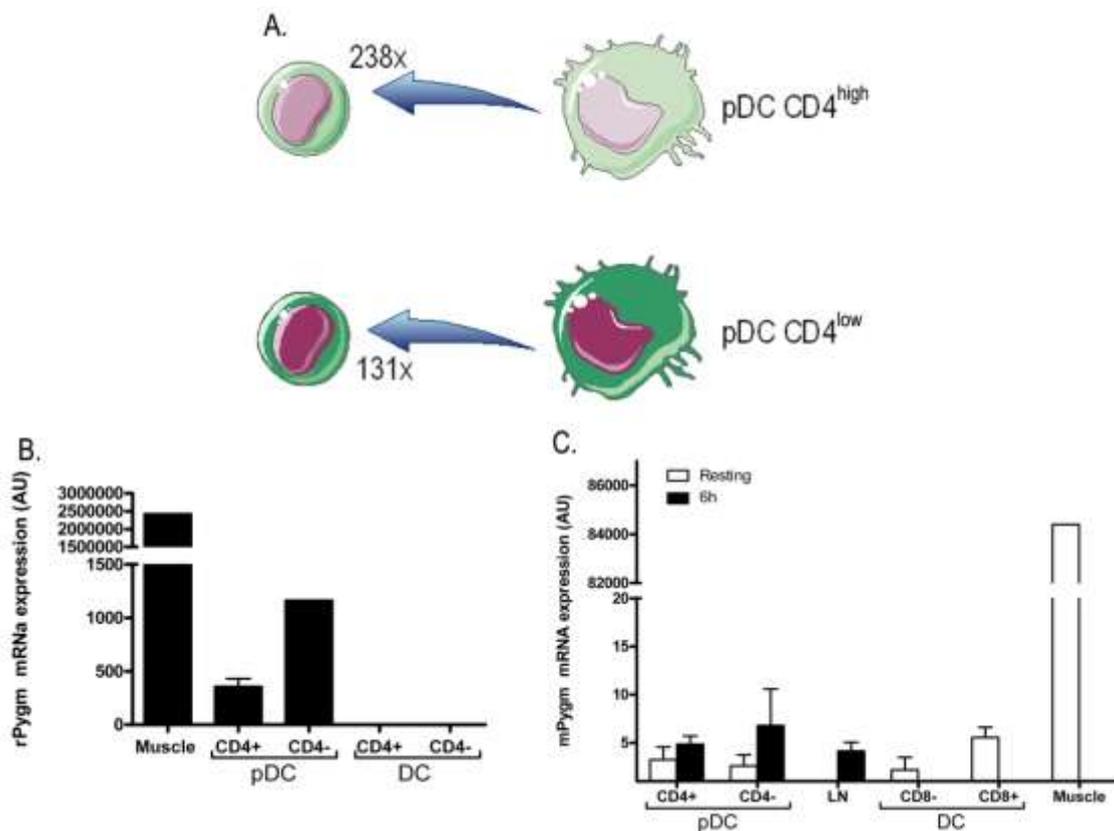


**Figure 25 - Validation des résultats de puces à ADNc obtenus pour le gène Granzyme C.** Différence d'expression du gène codant Granzyme C entre les pDC CD4<sup>high</sup> et CD4<sup>low</sup> fraîchement triées ou après maturation 24h en présence de CpG B. (B) Expression de l'ARNm Granzyme C dans les populations de pDC fraîchement triées ou après maturation 24h en présence de CpG B chez le rat.

### Pygm :

Le gène apparaît, de manière inattendue, fortement surexprimé dans les pDC CD4<sup>high</sup> fraîches par rapport aux matures (238 fois plus exprimé). C'est également le cas pour les pDC CD4<sup>low</sup> avec une expression 131 fois supérieure avant maturation (Figure 26A). Les résultats préliminaires de PCR quantitatives montrent effectivement une expression importante de l'ARNm Pygm dans les pDC fraîches comparées aux cDC fraîches. Cette expression reste toutefois dérisoire comparée au muscle où le gène Pygm est normalement exprimé (Figure 26B). Il reste à confirmer que son expression est effectivement down-régulée après maturation des pDC. Chez la souris les résultats sont différents. En effet, on n'observe aucune

expression significative de l'ARNm *Pygm* dans les pDC fraîches ou matures et dans les cDC fraîches. L'expression dans le muscle de souris est, comme chez le rat, très élevée (Figure 26C).

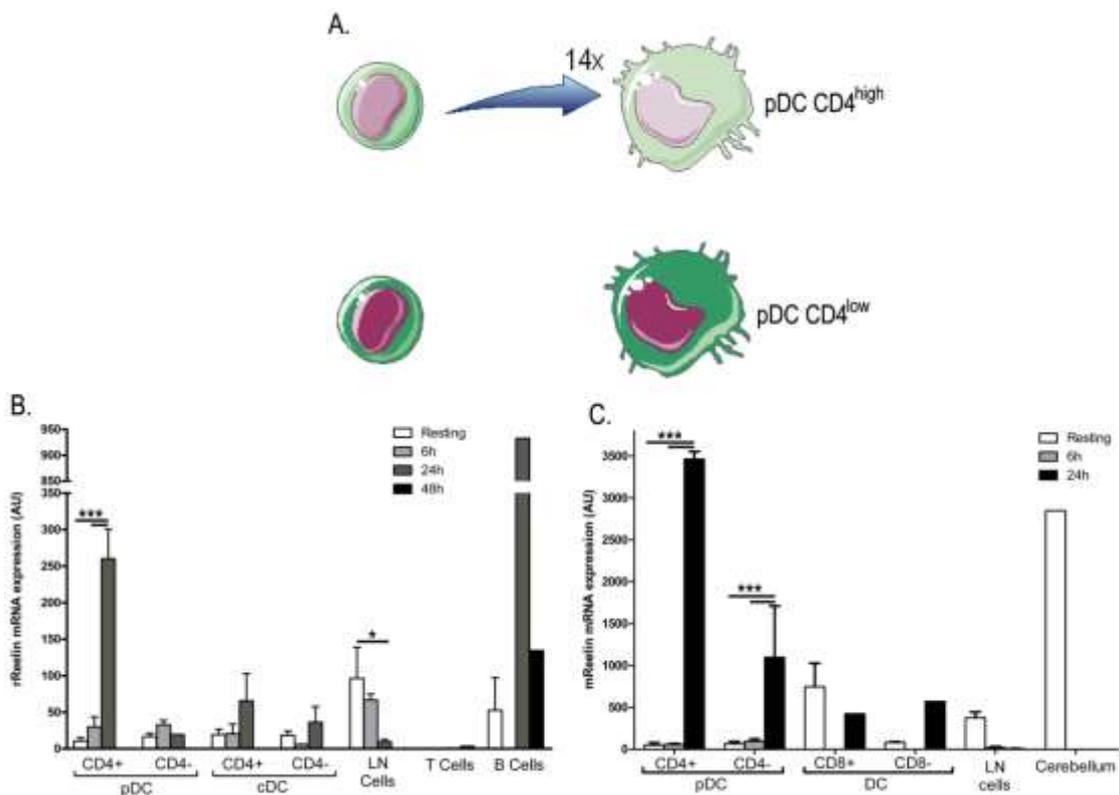


**Figure 26- Validation des résultats obtenus par puces à ADNc pour le gène *Pygm*.** (A) Différence d'expression du gène codant *Pygm* entre les pDC  $CD4^{high}$  et  $CD4^{low}$  fraîchement triées ou après maturation 24h en présence de CpG B. (B) Expression de l'ARNm *Pygm* dans les populations de DC fraîchement triées chez le rat. (C) Expression de l'ARNm *Pygm* dans les populations de DC fraîchement triées ou après maturation 6h en présence de CpG B chez la souris, dans les cellules ganglionnaires fraîchement préparées ou après activation 6h ou 24h en présence de Concanavalline A, ainsi que dans une préparation de cellules musculaire fraîche.

### Reeline :

Dans les analyses de puces à ADNc, la Reeline apparaît surexprimé seulement dans les pDC  $CD4^{high}$  après maturation (Figure 27A). Ces résultats sont bien confirmés par PCR quantitative comme le montre la Figure 27B. En effet, les pDC  $CD4^{high}$ , après 24h de maturation en présence de CpG B surexpriment l'ARNm de la Reeline. Les pDC  $CD4^{low}$ , quant à elles, l'expriment toujours aussi faiblement. Les DC  $CD4^{+}$  semblent légèrement surexprimer l'ARNm de la Reeline après 24h de maturation mais cette augmentation d'expression n'est pas significative. Les DC  $CD4^{-}$  ne semblent pas modifier leur expression de la Reeline qui reste faible. Les cellules ganglionnaires semblent perdre leur expression de la Reeline après

activation en présence de ConA. De manière intéressante, les cellules B surexpriment fortement la Reeline après maturation 24h en présence de CpG B, puis cette expression retombe après 48h. Chez la souris, les pDC CD4<sup>+</sup> montrent le même profil d'expression de l'ARNm de la Reeline, mais de manière encore plus marquée. En effet, le niveau d'expression est quasiment nul dans les cellules fraîches et après 6 heures de maturation. Mais après 24h, l'expression est très fortement augmentée. Cette expression est d'ailleurs plus importante que le niveau basal d'expression de la Reeline dans le cervelet. Les pDC CD4<sup>+</sup> surexpriment également la Reeline après 24 heures de maturation mais à un niveau plus faible. Ce qui n'était pas retrouvé chez le rat. Les DC CD8<sup>+</sup> down-régulent la Reeline après maturation, contrairement aux DC CD8<sup>-</sup> qui la surexpriment, même si les valeurs restent faibles comparées aux pDC CD4<sup>high</sup>, elles ne sont pas négligeables (Figure 27C).



**Figure 27 - Validation des résultats de puces à ADNc obtenus pour le gène de la Reeline.** (A) Différence d'expression du gène codant la Reeline entre les pDC CD4<sup>high</sup> et CD4<sup>low</sup> fraîchement triées ou après maturation 24h en présence de CpG B. (B) Expression de l'ARNm Reeline dans les populations de DC fraîchement triées ou après maturation 6h ou 24h en présence de CpG B chez le rat, dans des cellules ganglionnaires fraîchement préparées ou après maturation 6h ou 24h en présence de Concanavaline A, dans des LN ou B fraîchement triés ou après 24h de maturation en présence de Conca,avaline A pour les LT, et 24h et 48h en présence de CpG B pour les LB. (C) Expression de l'ARNm Reeline dans les populations de DC fraîchement triées ou après maturation 6h ou 24h en présence de CpG B chez la souris, dans les cellules ganglionnaires fraîchement préparée ou après activation 6h ou 24h en présence de Concanavaline A, ainsi que dans une préparation de cellules du cervelet fraîche. \*, p < 0,05; \*\*\*, p < 0,001

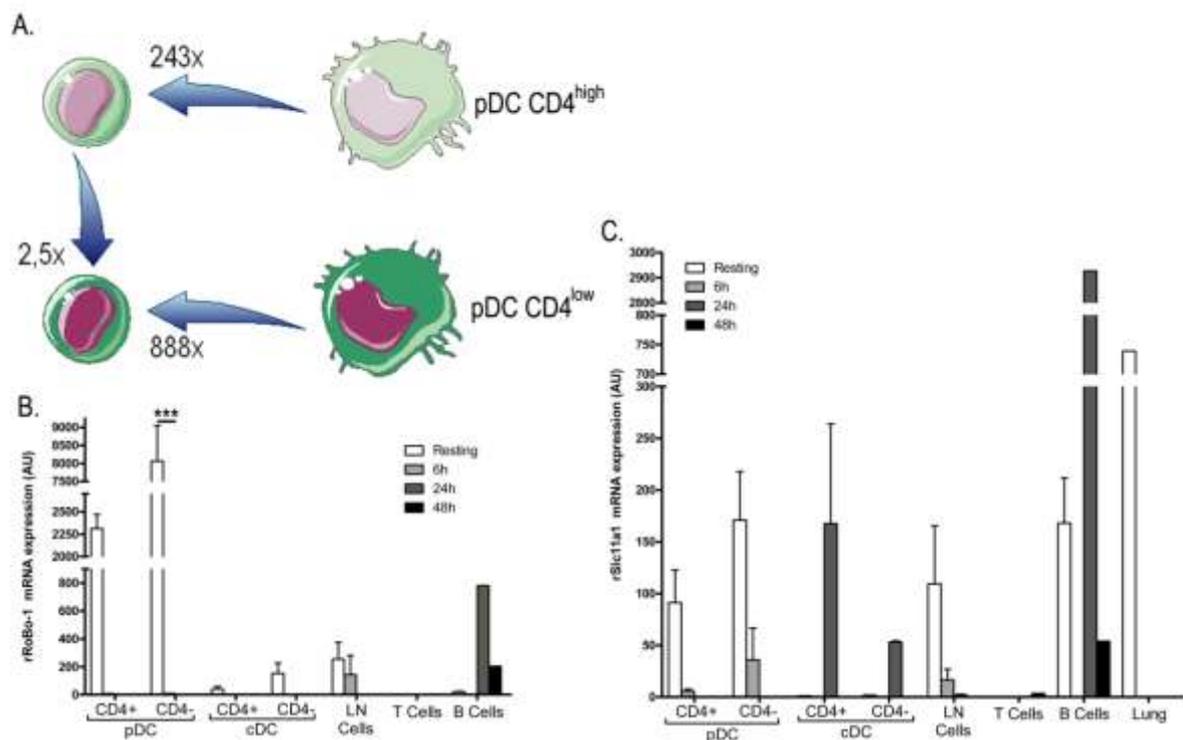
### **RoBo-1 :**

Ce gène, décrit dans une seule publication, apparaissait comme très fortement surexprimé dans les pDC CD4<sup>low</sup> fraîches comparées aux matures (888 fois plus exprimé). C'est également le cas pour les pDC CD4<sup>high</sup>, avec une expression 243 fois plus importante dans les cellules fraîches comparées aux matures. Les pDC CD4<sup>low</sup> fraîches l'exprimant légèrement plus que les pDC CD4<sup>high</sup> fraîches (Figure 28A). Pour vérifier cette expression par PCR quantitative, il a fallu être prudent dans le choix de la séquence car il existe un autre gène se nommant Robo1 plus connu mais n'ayant absolument rien à voir avec RoBo-1. En effet, RoBo-1, Rodent Bone -1, semble impliquer dans le remodellement osseux, alors que Robo1, roundabout axon guidance receptor homolog 1, est impliqué comme son nom l'indique dans le système nerveux pour la ramification des dendrites et le guidage axonale (Whitford et al., 2002; Jaworski et al., 2010) . Les résultats obtenus par PCR confirment bien ceux des puces. En effet, les pDC CD4<sup>high</sup> et CD4<sup>low</sup> expriment bien de manière constitutive un taux très élevé de RoBo-1 qui chute sévèrement après 6h de maturation. Les cDC fraîches expriment l'ARNm RoBo-1 mais à un taux faible comparées aux pDC, taux qui chute également après maturation. Les cellules B, contrairement aux autres, surexpriment l'ARNm RoBo-1 après 24h de maturation (Figure 28B).

Il n'existe pas de gène RoBo-1 décrit chez la souris. Il a donc été compliqué de trouver la correspondance de ce gène chez la souris. Il fallu attendre une mise à jour de la fiche RoBo-1 (NM\_031537) sur PubMed. En effet, il était alors décrit des synonymes du gène RoBo-1 : Slc11a1 (solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1) et Nramp1 (natural resistance-associated macrophage protein). C'est deux gènes codant la même protéine. Nous avons donc vérifié par PCR quantitative l'expression de Slc11a1 chez le rat pour confirmer qu'il s'agissait bien du même gène. Les résultats obtenus sont différents. L'expression par les pDC est bien down-régulée après maturation mais les valeurs sont beaucoup moins importantes que pour RoBo-1. Concernant les cDC, un profil inverse est observé. En effet, Slc11a1 apparaît surexprimé après maturation des cDC. Des résultats de puces publics montrant une expression du gène Slc11a1 dans les poumons, des échantillons de poumons de rat sont utilisés comme contrôle positif. De manière intéressante, On peut voir une expression très importante de l'ARNm Slc11a1 dans les LB après 24h activation en présence de CpG B (Figure 28C). Les résultats obtenus en PCR quantitative pour Slc1a1 et RoBo-1 apparaissent différent. RoBo-1 ne semble donc pas être le synonyme de Slc11a1.

Après alignement des séquences des deux gènes cela devient évident. En effet, sur les 1607 bp du gène RoBo-1 et les 2012 bp du gène Slc11a, seulement une séquence de 164 bp correspond entre les deux séquences.

Après comparaison du locus du gène Robo-1 de rat et de ses gènes avoisinants avec le génome de souris, nous avons trouvé un gène potentiellement similaire. Le gène Gm12253 (NM\_001045542), après alignement, apparaît en effet être identique à 90% à la séquence de RoBo-1. La prochaine étape sera donc la vérification de l'expression de ce gène par PCR quantitative sur les différentes populations de DC chez la souris.



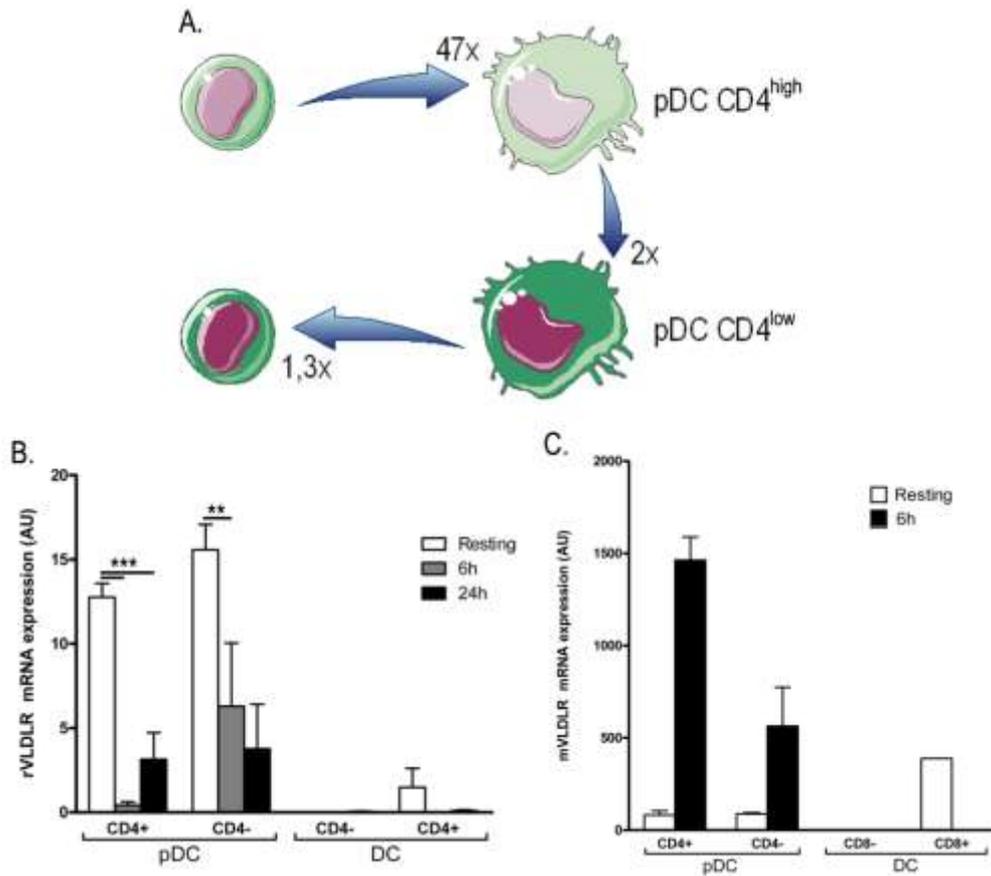
**Figure 28 - Validation des résultats de puces à ADNc obtenus pour le gène RoBo-1.** (A) Différence d'expression du gène codant la RoBo-1 entre les pDC CD4<sup>high</sup> et CD4<sup>low</sup> fraîchement triées ou après maturation 24h en présence de CpG B. (B) Expression de l'ARNm RoBo-1 dans les populations de DC fraîchement triées ou après maturation 6h ou 24h en présence de CpG B chez le rat, dans des cellules ganglionnaires fraîchement préparées ou après maturation 6h ou 24h en présence de Concanavaline A, dans des LT ou B fraîchement triés ou après 24h de maturation en présence de Concanavaline A pour les LT, et 24h et 48h en présence de CpG B pour les LB. (C) Expression de l'ARNm Slc11a1 dans les populations de DC fraîchement triées ou après maturation 6h ou 24h en présence de CpG B chez le rat, dans les cellules ganglionnaires fraîchement préparée ou après activation 6h ou 24h en présence de Concanavaline A, dans des LT ou B fraîchement triés ou après 24h de maturation en présence de Concanavaline A pour les LT, et 24h et 48h en présence de CpG B pour les LB ainsi que dans une préparation de cellules pulmonaires fraîche. \*\*\*, p < 0.001

**TRANCE :**

La validation des résultats de puces à ADNc obtenus pour le gène TRANCE feront l'objet de l'article 2. Je n'en parlerais donc pas ici.

**VLDLR :**

La seule différence significative d'expression du gène VLDLR dans les puces à ADNc est retrouvée entre les pDC CD4<sup>high</sup> fraîches et maturées. En effet, le gène est 47 fois plus exprimé après maturation. Ces résultats ne sont pas validés par PCR quantitative où il apparaît sous-exprimé dans les pDC CD4<sup>high</sup> après maturation (Figure 29A). C'est également le cas pour les pDC CD4<sup>low</sup>. Quant aux cDC, elles ne semblent pas exprimer de manière significative le gène VLDLR (Figure 29B). Chez la souris en revanche, les résultats préliminaires obtenus confirment les résultats des puces. En effet, les pDC CD4<sup>+</sup> de souris surexpriment l'ARNm VLDLR après 6 heures de maturation seulement. Le même phénomène est observé pour les pDC CD4<sup>-</sup> de souris mais avec une induction moins importante de l'expression de l'ARNm VLDLR après maturation. Les résultats préliminaires observés sur les cDC fraîches montrent une absence d'expression de l'ARNm VLDLR par les DC CD8<sup>-</sup> fraîches contrairement aux DC CD8<sup>+</sup> fraîches qui l'expriment de manière assez importante (Figure 29C).



**Figure 29 - Validation des résultats obtenus par puces à ADNC pour le gène VLDLR.** (A) Différence d'expression du gène codant VLDLR entre les pDC CD4<sup>high</sup> et CD4<sup>low</sup> fraîchement triées ou après maturation 24h en présence de CpG B. (B) Expression de l'ARNm VLDLR dans les populations de DC fraîchement triées ou après maturation 6h ou 24h en présence de CpG B chez le rat. (C) Expression de l'ARNm VLDLR dans les populations de DC fraîchement triées ou après maturation 6h en présence de CpG B chez la souris. \*\*, p < 0.01; \*\*\*, p < 0.001

## **V. Etude de l'expression et de la fonction de TRANCE par les populations de pDC chez le rat**

### **Article 2: Constitutive expression of TRANCE by rat plasmacytoid dendritic cells**

Thomas Anjubault, Dominique Heymann, Francois-Xavier Hubert and Régis Josien

Résumé de l'article 2:

Chez le rat, les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) ont un phénotype CD11b- CD103- CD45R+ CD4<sup>high</sup> (pDC CD4<sup>high</sup>). Notre équipe a récemment caractérisé une sous-population de pDC CD4<sup>low</sup> ayant de fortes homologues avec les pDC CD4<sup>high</sup>. L'analyse de résultats de puces à ADNc réalisées sur les deux populations a montré une expression constitutive de l'ARNm TRANCE (TNF-related activation-induced cytokine) par les pDC CD4<sup>high</sup> fraîches. TRANCE, principalement exprimé par les ostéoblastes et les cellules stromales, entraîne la maturation et l'activation des précurseurs d'ostéoclastes en ostéoclastes fonctionnels par interaction avec son récepteur RANK (receptor activator of NF-κB). L'interaction TRANCE-RANK induit améliore aussi la survie des DC matures qui expriment RANK par contact avec les LT matures exprimant TRANCE. Cette expression de l'ARNm TRANCE par les pDC CD4<sup>high</sup> fraîches a été confirmée au niveau protéique, sous forme membranaire et produite sous forme soluble. Les pDC CD4<sup>low</sup> expriment fortement TRANCE après maturation, aussi bien sous forme membranaire que soluble.

## **Constitutive expression of TRANCE by rat plasmacytoid dendritic cells**

Thomas Anjubault <sup>1</sup>, Dominique Heymann <sup>2,3</sup>, François-Xavier Hubert <sup>1</sup> and Régis Josien

<sup>1,3,4</sup>

1 INSERM UMR 643, F -44000, France

2 INSERM UMR 791, F -44000, France

3 Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F- 44000, France

4 CHU Nantes, Laboratoire d'immunologie, Nantes, F- 44000, France

## Introduction

Dendritic cells (DC), as antigen presenting cells (APC), play a key role in the induction of adaptive immunity (Banchereau et Steinman, 1998). Several DC subsets with specific phenotype and function have been described in human and mouse model (Pulendran, 2004; Shortman et Liu, 2002). The two main DC populations described are conventional DC (cDC) and plasmacytoid DC (pDC). pDC have been first described as plasmacytoid monocytes (Facchetti et al., 1989) and plasmacytoid T cells (Facchetti et al., 1988). They were finally described as DC in the 1990s (Grouard et al., 1997) and as natural IFN-producing cells (Siegal et al., 1999). Indeed, pDC produce enormous amounts of type 1 interferon (IFN) upon viral infection (Asselin-Paturel et Trinchieri, 2005) correlating to their Toll-like receptor (TLR) pattern expression restricted to TLR7 and 9. pDC subsets with different phenotype and function have been described. In human CD2<sup>+</sup> and CD2<sup>-</sup> pDC have been described with a possible cytotoxic activity for the CD2<sup>+</sup> pDC expressing lysozyme (Matsui et al., 2009). BDCA-4 pDC subsets expressing high or low levels of CD123 have also been described in patients with multiple sclerosis where the predominance of one or the other subset is correlated with the gravity of the disease (Schwab et al., 2010). In mouse, CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>-</sup> pDC have been identified with CD4<sup>-</sup> pDC identified as the major source of pDC that migrate into lymph nodes in response to infection (Yang et al., 2005). In rats, we have described a similar dichotomy. CD4<sup>high</sup> pDC is the population we previously described as the rat counterparts of mouse and human pDC (Hubert et al., 2004); CD4<sup>low</sup> pDC appeared quite similar in their phenotype and function. Both subsets show a distinct distribution, with CD4<sup>high</sup> pDC predominant in secondary lymphoid organs and CD4<sup>low</sup> pDC predominant in bone marrow and blood.

As APC, pDC were shown to induce activation of naive CD8<sup>+</sup> T cell. Some studies also suggest that pDC can phagocyte exogenous antigen and present these exogenous peptides on CMH II molecules to induce proliferation of CD4<sup>+</sup> T cells (Hoeffel et al., 2007; Piccioli et al., 2009; Stent et al., 2002). The induction of a significative proliferation of naive T cell, apart from the interaction between the complex CMH-peptide and T cell receptor, requires a costimulatory signal. This signal is provided by costimulatory molecules interactions as B7 and CD28 and others. Among these costimulatory molecules, RANK has been

described to be expressed on mature DC and TRANCE, its receptor, expressed on activated T cells (Bachmann et al., 1999).

TRANCE is a member of the TNF superfamily. It is also called receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL), osteoprotegerin ligand (OPGL), osteoclast differentiation factor (ODF), TNFSF11 and CD254. TRANCE binds to the receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK) also known as TRANCE-receptor, and to the decoy receptor osteoprotegerin (OPG). TRANCE is expressed mainly on osteoblasts and stromal cells (Lacey et al., 1998; Yasuda et al., 1998) inducing maturation and activation of osteoclast (OC) precursor in fully functional OC able to degrade bone matrix. Stromal cells, activated T and B cells were also shown to express TRANCE (Anderson et al., 1997; Josien et al., 1999; Wong et al., 1997a). Besides playing key role in osteoclastogenesis (Fuller et al., 1998), TRANCE-RANK interaction promotes mature DCs survival and cytokine secretion in DC (Josien et al., 2000). In vivo, TRANCE-RANK interaction was shown to play an important role in CD40L-independent CD4<sup>+</sup> T cell response to virus. TRANCE is also essential for lymph node organogenesis (Kong et al., 1999). Indeed, mice deficient for TRANCE gene lacks all the lymph nodes. They also exhibit severe osteopetrosis, a consequence of their lack of osteoclasts. In fact, TRANCE plays a key role in linking bone physiology and immune system.

We report, herein, that rat pDC constitutively expressed TRANCE mRNA and confirmed the expression of both membrane and soluble form of the protein.

## Materials and Methods

### Animals

Lewis rats, from 8 to 12 week old were obtained from the Centre d'Elevage Janvier (Le Genest St Isles, France).

### Reagents

The phosphodiester oligonucleotide containing the CpG motif (CpG ODN) 2006 (tcgtcgttttgcgttttgcgtt) and 2216 (ggGGGACGATCGTCgggggg) were synthesized by Eurofins MWG Operon. Monensine, brefeldin A and Concanavaline A were obtained from Sigma-Aldrich.

### Antibodies

The Rank-human Fc fusion molecule and the mTRANCE-human CD8 fusion molecule were kindly provided by Yongwon Choi (University of Pennsylvania, Philadelphia). CD4-Phycoerythrin (PE)-Cy7, and CD45R-PE monoclonal antibody were purchased from BD Biosciences (Mountain View, CA). R7/3 (TCR $\alpha\beta$ ), OX8 (CD8), OX12 (Ig $\kappa$ ), OX33 (CD45RA), OX35 (CD4), OX42 (CD11b/c) hybridomas were obtained from the European Collection of Cell Culture, and mAb were purified from supernatants followed or not by coupling to Alexa Fluor 647 and Alexa Fluor 488 (kits from Molecular Probes). The anti-human Fc-FITC monoclonal antibody was purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.

### Dendritic cells sorting

**Conventional DC.** DC CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>-</sup> were isolated as previously described (Voisine et al., 2002). Briefly, after digestion in collagenase, low density spleen cells were selected on a 14.5% Nycodenz (Nycomed, Oslo, Norway) gradient. CD103<sup>+</sup> cells were then selected using OX62+MACS microbeads (Miltenyi Biotec) and stained with CD103-Alexa Fluor 647 (Clone OX62) and CD4-PE mAbs. CD103<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> and CD103<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> cells were sorted using a FACS Aria (BD Biosciences)

**Plasmacytoid DC.** Spleens were perfused with 2mg/mL Collagenase D (Roche) in RPMI 1640/ 1% FCS, chopped into small pieces and incubated 25min at 37°C. EDTA (10mM) was added, and the cell suspension was pipetted up and down for 5min and filtered on 100µm. Cells were washed in PBS/0.5 mM EDTA/2% FCS and mononuclear cells were isolated by centrifugation over Ficoll-Plaque Plus (Amersham, Les Ulis, France). T and partial B cell depletion was then performed by incubating cells with CD8 (OX8), Igκ (OX12), CD45RA (OX33), CD11b/c (OX42), TCRαβ (R7.3) and TCRγδ (V65) mAbs and anti-mouse IgG-coated magnetic beads (DynaL Biotech, Oslo, Norway). After staining with biotinylated 85C7 mAb, cells were incubated with anti-biotin conjugated MACS Microbeads following the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). Positive selection was performed on AutoMACS Separator (Miltenyi Biotec). Cells were then stained with Streptavidine-PerCp Cy5.5, CD4-Alexa Fluor 647 (OX35) and CD45R-PE (HIS24) mAbs. 85C7+ CD45R+ CD4<sup>high</sup> and 85C7+ CD45R+ CD4<sup>low</sup> cells were sorted on a FACS Aria (BD biosciences). Purity was routinely >99%.

#### **Flow cytometry analysis**

Cells were stained using PBS diluted Ab and washed with PBS/0.2% FCS/0.01% Azide. Intracellular staining was realised using the Fixation/Permeabilization Diluent (eBioscience, cat. [00-5223](#)) and the Permeabilization Buffer (10X) (eBioscience, cat. [00-8333](#)) according to manufacturer's instructions. Cells were then acquired on a BD FACS LSRII (BD biosciences) and results were analyzed using FlowJo software (Version 8, Treestar).

#### **Real-Time Quantitative PCR**

Total RNA from 2 x 10<sup>5</sup> to 2 x 10<sup>6</sup> resting or stimulated DC subsets and lymph node cells was extracted using Trizol (Life Technologies, Paisley, U.K.) and synthesized to cDNA. Real-time quantitative PCR was performed with this cDNA using an Applied Biosystems GenAmp 7700 Sequence Detection System. TaqMan probes sequences used were: rTRANCE forward: CAGAAATATCAGAAGACAGCACGC; rTRANCE reverse: AGCCACGAACCTCCATCAT, resulting in a 225-bp PCR product in rat model; and rHPRT forward: CCTTGGTCAAGCAGTACAGCC; rHPRT reverse: TTCGCTGATGACACAAACATGA, resulting in a 188-bp PCR product; mTRANCE forward: CACACCTCACCATCAATGCTG; mTRANCE reverse: AGAATTGCCCGACCAGTTTT resulting in a 307-bp PCR product in mouse model; Total cDNA was amplified in a 25 µL reaction PCR mix constituted of 10 µL of diluted cDNA, 12.5 µL of TaqMan SybrGreen 2x PCR Master Mix (Applied Biosystems, Applera, Courtaboeuf, France)

containing AmpliTaq Gold DNA polymerase, dNTPs with dUTP and optimized buffer components, and 0.8  $\mu$ L of 20x TaqMan probes. The reaction started with a step of 2 min at 50°C and 10 min at 95°C followed by 40 cycles consisting of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. Relative expression was calculated using the  $-2^{\Delta\Delta Ct}$  method and expressed in arbitrary units.

### **ELISA test**

The amount of soluble TRANCE in the supernatants of DC and lymph node cell cultures was measured using a mouse ELISA kit (R&D systems, Minneapolis, MN) according to the manufacturer's instructions.

### **Osteoclast Differentiation Assay**

Tibias and femurs were harvested under sterile condition and washed with 75% alcohol. Bone Marrow (BM) was washed out with PBS/0.5 mM EDTA/2% FCS using disposable syringes. Cells were washed after red blood cell lysis, and suspended at  $10^7$  cells/mL in MEM Alpha Medium (GIBCO, USA)/10% FCS in 6-well culture plates. During the 16 first hours of culture at 37°C, BM cells are in the presence of 5 ng/mL of Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF)(Peprotech, Rocky Hill, NJ). After this step, non-adherent cells are washed and cultured for 3 more days with 30 ng/mL M-CSF and 1ng/mL transforming growth factor (TGF- $\beta$ )(R&D systems). Then adherent cells, after washing, are cultured in the presence of 30 ng/mL M-CSF and various conditions: With or without soluble TRANCE at 100 ng/mL, in the presence or not of pDC, resting or stimulated 3 hours with 5  $\mu$ M CpG ODN 2006 and in the presence or not of lymph node cells stimulated 24h with 5  $\mu$ g/mL Concanavaline A. After three days, presence or absence of osteoclasts is revealed by tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining (Leukocyte Acid Phosphatase Assay kit; Sigma) (Kim et al., 2005a).

### **Statistical analysis**

Statistical significance was evaluated using a two-way ANOVA test and a Bonferoni Post-test.  $p \leq 0,05$  were considered significant.

## Results and discussion

### ***Constitutive TRANCE mRNA expression by rat pDC***

To identify genes specifically expressed in various DC subsets in rats, we compared gene expression with rat specific gene arrays (Applied Biosystems) in CD4<sup>+</sup> cDC, CD4<sup>-</sup> cDC and pDC purified from spleen. Gene expression was assessed in freshly extracted cells as well as after 24 h stimulation by type B CpG. Surprisingly, among the genes found to be specifically expressed in resting pDC, we identified TRANCE. We confirmed these data using real time QPCR (Fig. 1A). As a positive control, we used concanavalin A-activated lymph node cells (Josien et al., 1999). The level of TRANCE mRNA expression in resting pDC was similar to that observed at the peak of expression in activated T cells (6 hours). TRANCE mRNA was not expressed in CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>-</sup> cDC, at the resting state.

Using a newly generated monoclonal antibody against rat pDC (clone 85C7), we recently identified 2 pDC subsets based on the expression of CD4 (Fig 1C) (Anjubault et al, Unpublished results). In the spleen, the majority of pDC expressed high levels of CD4 and CD4<sup>low</sup> pDC represented 10-20% of total 85C7<sup>+</sup> cells. We described these cells as a pDC subset and showed that they share most of the characteristics of rat pDC usually described. However, TRANCE expression appeared to be differentially regulated in these two subsets (Fig. 1B). A high level of TRANCE mRNA expression by resting CD4<sup>high</sup> pDC was confirmed by real time PCR and this expression was rapidly down-regulated after type B CpG-induced maturation. Similar results were obtained after stimulation by CD40L or influenza. Type A CpG appeared to maintain TRANCE expression during the first 6 hours but induced a dramatic down regulation at 24h. In CD4<sup>low</sup> pDC, a very low level of TRANCE mRNA was detected at resting state (Fig. 1B). TLR 9-mediated stimulation induced a strong upregulation of TRANCE at 6 h followed by a down regulation at 24h. At 6h the levels of TRANCE expression in CD4<sup>low</sup> pDC were 2-fold higher than in resting CD4<sup>high</sup> pDC.

The mRNA for TRANCE-receptor, also called RANK, was not expressed by DC at resting state but, it was strongly upregulated after maturation in both CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>-</sup> cDC and also in CD4<sup>high</sup> pDC. However, unlike on cDC, RANK protein expression was not detected at the surface of pDC after maturation (data not shown). The same expression profile was

found for the decoy receptor of TRANCE, OPG, with a higher expression at resting state for CD4<sup>+</sup> cDC.

### **TRANCE protein expression on rat pDC**

TRANCE protein expression on pDC was assessed using a polyclonal Ab to mTRANCE, a fusion protein between murine RANK and a human Fc fragment (RANK-Fc), or OPG-Fc. We could detect TRANCE expression on CD4<sup>high</sup> pDC with all these reagents. OPG-Fc gave the strongest staining but because OPG is known to also bind to TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) (Emery et al., 1998) and pDC can express TRAIL under certain conditions (Chaperot et al., 2006b), we decided to use Rank-Fc in the following experiments (Fig. 2A). The specificity of Rank-Fc recognition was confirmed by blocking the fusion protein with soluble TRANCE as shown in figure 2C. As a positive control, we used as we previously described (Josien et al., 1999) conA activated lymph node T cells which exhibited surface TRANCE expression after 24 h stimulation (Fig 2B).

Confirming the PCR data we observed constitutive TRANCE expression on resting CD4<sup>high</sup> pDC but not CD4<sup>+</sup> or CD4<sup>-</sup> DC (Fig. 3A). This expression was maintained after 24 h of stimulation by CpG whereas it was not detected on activated cDC.

To confirm the specificity of constitutive TRANCE expression on pDC, we assessed TRANCE expression on various and resting immune cell subsets (CD4<sup>+</sup> T cells, CD8<sup>+</sup> T cells, B cells, NK cells, CD11b/C<sup>+</sup> cells, cDC). Unlike pDC, these cells stained negative (Fig 3B).

We could detect a clear intracellular expression of TRANCE in pDC (Data not shown). The difference between intracellular and membrane expression could be due to the production of the soluble form of TRANCE instead of the membrane form or could also be due to the cleavage of the membrane form by the metalloprotease TACE (ADAM17) which is known to release the membrane form of TRANCE into a soluble form (Lum et al., 1999b). DNA Chip results showed that all DC subsets express highly TACE mRNA (Thomas Anjubault, F-X Hubert, Regis Josien, unpublished observations). Thus the production of this enzyme may release the membrane form of TRANCE into a soluble form.

Next we assessed TRANCE expression on pDC from different immune compartments (lymph node, thymus, bone marrow and blood) (Fig. 3C). In all organs analysed, pDC were found to express TRANCE yet at different levels. The highest expression was found on pDC from mesenteric lymph nodes.

We also compared the kinetics of TRANCE expression on purified CD4<sup>high</sup> versus CD4<sup>low</sup> pDC (Fig. 4A). As expected TRANCE protein was expressed at very low levels on resting CD4<sup>low</sup> pDC. Following activation by CpG, TRANCE expression was maintained on CD4<sup>high</sup> pDC for at least 48h whereas its expression was strongly induced on CD4<sup>low</sup> pDC. We previously showed that CD4<sup>low</sup> pDC were the predominant subset in the bone marrow as in blood than CD4<sup>high</sup> pDC. So these cells could, in viral infection state, unsettle the balance between bone formation and resorption by their strong induction of TRANCE expression in favour of bone degradation.

Because pDC express CD45R, a B cells marker (Coffman, 1982), and in mouse and human model, B cells were described to express TRANCE after maturation (Kawai et al., 2006; Choi et al., 2001), we investigate TRANCE expression on resting and activated sorted rat B cells. In our hand, resting or activated B cells did not express TRANCE protein (data not shown). Previous studies have shown that TRANCE is constitutively expressed on a subset of CD4<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> progenitor cells which are involved in induction of lymphoid tissues (Lane et al., 2006). Because pDC exhibit a CD4<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> phenotype we sought to discriminate these populations.

As shown in figure 4B, we identified a population of CD4<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> cells presenting a lower expression of CD4 than pDC and which also express TRANCE at low levels. However CD4<sup>high</sup> pDC could be easily identified based on CD4 expression and therefore distinct from CD4<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> cells.

We failed to detect TRANCE expression on pDC in mice. In human, analysis of public data from gene array experiment, indicate that resting human pDC did not express TRANCE mRNA. TRANCE being highly conserved between species and pDC also, it is surprising that TRANCE expression on pDC is restricted to rat model. It could be due to evolutionary modifications specific to rat phylogeny.

### ***Soluble TRANCE protein production by pDC***

It is well described in human, mouse and rat models there is a membrane bound form and a soluble form of TRANCE protein. Using an available ELISA for mouse TRANCE, we were able to detect rat TRANCE (Fig 5). In supernatants from ConA-stimulated lymph node T cells which serve as positive control, we could detect an increased quantity of soluble TRANCE from 6h to 48h of culture. We did not detect significant levels of TRANCE in the supernatant

of either CD4<sup>+</sup> or CD4<sup>-</sup> cDC. After 24h culture with TLR 9 ligands, CD4<sup>high</sup> pDC produce 150 pg/mL  $\pm$  12 pg/mL of soluble TRANCE. Consistent with their higher expression of TRANCE mRNA after stimulation, CD4<sup>low</sup> pDC produce 2 fold more soluble TRANCE when they were cultured 24h with a TLR9 ligand. Interestingly, these levels were higher than that produced by activated T cells. We could not detect soluble TRANCE in the supernatants of purified rat B cells cultured 24h and 48h with CpG A or B or LPS (data not shown).

### ***Osteoclastogenesis mediated by pDC***

We finally sought to assess whether rat pDC could induce osteoclastogenesis in vitro. Indeed, osteoclastogenesis mediated by TRANCE expressing T cells is already described (Kawai et al., 2006). We adapted a murine protocol of osteoclastogenesis (Kim et al., 2005a) to rat model, and could generate osteoclasts using soluble TRANCE. We found that CD4<sup>high</sup> and CD4<sup>low</sup> pDC, after a short-term stimulation or 24h with CpG 2006, were not able to promote osteoclastogenesis and actually inhibit soluble TRANCE-mediated osteoclastogenesis (Fig 6). It is well established that factors such as IL-4, -10, -12, -13, -18, GM-CSF, IFN $\alpha$  (Avnet et al., 2007) and IFN $\gamma$  inhibit osteoclastogenesis. Rat pDC produce many different cytokines after activation by CpG (Hubert et al., 2004), among them are IL-12, GM-CSF and IFN $\alpha$ . This inhibitory effect of activated pDC is therefore likely mediated by such inflammatory mediators. Moreover, the amount of soluble TRANCE produced by pDC which is almost 1,000-fold lower than the quantity of exogenous TRANCE necessary to induce osteoclasts formation in vitro. We also performed experiment with resting CD4<sup>high</sup> pDC and fixed pDC but failed to induced osteoclastogenesis.

This does not exclude a potential role of pDC in regulating bone homeostasis in vivo as pDC might cooperate with other cells such as osteoblastic stromal cells, osteoblasts or bone marrow stromal cells which, in response to IL-6 produced by activated pDC, can produce soluble TRANCE (Kramer et Gaffen, 2007).

### ***Conclusion***

In conclusion, our data indicate that rat CD4<sup>high</sup> pDC constitutively expressed TRANCE both at the mRNA and the protein levels. Although TRANCE is expressed at very low levels on resting CD4<sup>low</sup> pDC, it is strongly upregulated after TLR mediated activation. TRANCE was found to be expressed as a membrane bound and a soluble protein, the levels of which

were similar or higher than that produced by activated T cells. Intriguingly this specific phenotype of pDC appears to be rat-specific as we did not find evidence of TRANCE expression on murine or human pDC. The functional role of TRANCE on pDC remains to be determined. Given the critical role of TRANCE in osteoclastogenesis, pDC could play such as activated T cells, a role in regulating bone metabolism. Previous studies have shown that pDC are rapidly recruited in specific inflammatory tissues. Through their expression of TRANCE in this inflammatory site, such as synovial inflammation, they could deregulate the balance between bone formation and resorption in favour of bone degradation and induce bone or cartilage disorder as it is the case for Th17 cells in rheumatoid arthritis (Takayanagi, 2007). This hypothesis brings pDC into the field of osteoimmunology. In the immune system, through their expression of TRANCE, pDC could act as survival and activating factor for cDC (Josien et al., 2000). Interestingly, recent studies indicate that pDC could enhance cDC function through CD40L expression (Yoneyama et al., 2005; Kuwajima et al., 2006). Therefore both CD40L and TRANCE, which share important functions and signalling pathways, could be involved in pDC-cDC cooperation for enhancing specific immune responses.

## References

- Anderson, D. M., Maraskovsky, E., Billingsley, W. L., Dougall, W. C., Tometsko, M. E., Roux, E. R., Teepe, M. C., DuBose, R. F., Cosman, D., et Galibert, L. (1997). A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390, 175-179.
- Asselin-Paturel, C., et Trinchieri, G. (2005). Production of type I interferons: plasmacytoid dendritic cells and beyond. *J Exp Med* 202, 461-5.
- Avnet, S., Cenni, E., Perut, F., Granchi, D., Brandi, M. L., Giunti, A., et Baldini, N. (2007). Interferon-alpha inhibits in vitro osteoclast differentiation and renal cell carcinoma-induced angiogenesis. *Int. J. Oncol* 30, 469-476.
- Bachmann, M. F., Wong, B. R., Josien, R., Steinman, R. M., Oxenius, A., et Choi, Y. (1999). TRANCE, a tumor necrosis factor family member critical for CD40 ligand-independent T helper cell activation. *J Exp Med* 189, 1025-31.
- Banchereau, J., et Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-52.
- Chaperot, L., Blum, A., Manches, O., Lui, G., Angel, J., Molens, J., et Plumas, J. (2006). Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol* 176, 248-255.
- Choi, Y., Woo, K. M., Ko, S. H., Lee, Y. J., Park, S. J., Kim, H. M., et Kwon, B. S. (2001). Osteoclastogenesis is enhanced by activated B cells but suppressed by activated CD8(+) T cells. *Eur. J. Immunol* 31, 2179-2188.
- Coffman, R. L. (1982). Surface antigen expression and immunoglobulin gene rearrangement during mouse pre-B cell development. *Immunol. Rev* 69, 5-23.
- Emery, J. G., McDonnell, P., Burke, M. B., Deen, K. C., Lyn, S., Silverman, C., Dul, E., Appelbaum, E. R., Eichman, C., DiPrinzio, R., et al. (1998). Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem* 273, 14363-14367.
- Facchetti, F., de Wolf-Peeters, C., Mason, D. Y., Pulford, K., van den Oord, J. J., et Desmet, V. J. (1988). Plasmacytoid T cells. Immunohistochemical evidence for their monocyte/macrophage origin. *Am. J. Pathol* 133, 15-21.
- Facchetti, F., de Wolf-Peeters, C., van den Oord, J. J., de Vos, R., et Desmet, V. J. (1989). Plasmacytoid monocytes (so-called plasmacytoid T-cells) in Kikuchi's lymphadenitis. An immunohistologic study. *Am. J. Clin. Pathol* 92, 42-50.
- Fuller, K., Wong, B., Fox, S., Choi, Y., et Chambers, T. J. (1998). TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med* 188, 997-1001.
- Grouard, G., Risoan, 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.
- Hoefel, G., Ripoché, A., Matheoud, D., Nascimbeni, M., Escriou, N., Lebon, P., Heshmati, F., Guillet, J., Gannagé, M., Caillat-Zucman, S., et al. (2007). Antigen crosspresentation

- by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 27, 481-492.
- 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<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>CD11b-OX62<sup>-</sup> and type I IFN-producing cells that exhibit selective expression of Toll-like receptors 7 and 9 and strong responsiveness to CpG. *J Immunol* 172, 7485-94.
- Josien, R., Li, H. L., Ingulli, E., Sarma, S., Wong, B. R., Vologodskaja, M., Steinman, R. M., et Choi, Y. (2000). TRANCE, a tumor necrosis factor family member, enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 191, 495-502.
- Josien, R., Wong, B. R., Li, H. L., Steinman, R. M., et Choi, Y. (1999). TRANCE, a TNF family member, is differentially expressed on T cell subsets and induces cytokine production in dendritic cells. *J Immunol* 162, 2562-8.
- Kawai, T., Matsuyama, T., Hosokawa, Y., Makihira, S., Seki, M., Karimbux, N. Y., Goncalves, R. B., Valverde, P., Dibart, S., Li, Y., et al. (2006). B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am. J. Pathol* 169, 987-998.
- Kim, K., Kim, J. H., Lee, J., Jin, H., Lee, S., Fisher, D. E., Kook, H., Kim, K. K., Choi, Y., et Kim, N. (2005). Nuclear factor of activated T cells c1 induces osteoclast-associated receptor gene expression during tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine-mediated osteoclastogenesis. *J. Biol. Chem* 280, 35209-35216.
- Kong, Y. Y., Boyle, W. J., et Penninger, J. M. (1999). Osteoprotegerin ligand: a common link between osteoclastogenesis, lymph node formation and lymphocyte development. *Immunol Cell Biol* 77, 188-93.
- Kramer, J. M., et Gaffen, S. L. (2007). Interleukin-17: A New Paradigm in Inflammation, Autoimmunity, and Therapy. *Journal of Periodontology* 78, 1083-1093.
- Kuwajima, S., Sato, T., Ishida, K., Tada, H., Tezuka, H., et Ohteki, T. (2006). Interleukin 15-dependent crosstalk between conventional and plasmacytoid dendritic cells is essential for CpG-induced immune activation. *Nat. Immunol* 7, 740-746.
- Lacey, D. L., Timms, E., Tan, H. L., Kelley, M. J., Dunstan, C. R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., et al. (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93, 165-76.
- Lane, P. J., Kim, M. Y., Gaspal, F. M., et McConnell, F. M. (2006). CD4<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> cells regulate the organization of lymphoid tissue and T-cell memory for antibody responses. *Int J Hematol* 83, 12-6.
- Lum, L., Wong, B. R., Josien, R., Becherer, J. D., Erdjument-Bromage, H., Schlondorff, J., Tempst, P., Choi, Y., et Blobel, C. P. (1999). Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J Biol Chem* 274, 13613-8.
- Matsui, T., Connolly, J. E., Michnevitz, M., Chaussabel, D., Yu, C., Glaser, C., Tindle, S., Pypaert, M., Freitas, H., Piqueras, B., et al. (2009). CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions. *J. Immunol* 182, 6815-6823.
- Piccioli, D., Sammicheli, C., Tavarini, S., Nuti, S., Frigimelica, E., Manetti, A. G. O., Nuccitelli, A., Aprea, S., Valentini, S., Borgogni, E., et al. (2009). Human plasmacytoid dendritic cells

- are unresponsive to bacterial stimulation and require a novel type of cooperation with myeloid dendritic cells for maturation. *Blood* 113, 4232-4239.
- Pulendran, B. (2004). Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors. *Immunol. Rev* 199, 227-250.
- Schwab, N., Zozulya, A. L., Kieseier, B. C., Toyka, K. V., et Wiendl, H. (2010). An imbalance of two functionally and phenotypically different subsets of plasmacytoid dendritic cells characterizes the dysfunctional immune regulation in multiple sclerosis. *J. Immunol* 184, 5368-5374.
- Shortman, K., et Liu, Y. J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2, 151-61.
- Siegal, F. P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P. A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., et Liu, Y. J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284, 1835-1837.
- Stent, G., Reece, J. C., Baylis, D. C., Ivins, K., Paukovics, G., Thomson, M., et Cameron, P. U. (2002). Heterogeneity of freshly isolated human tonsil dendritic cells demonstrated by intracellular markers, phagocytosis, and membrane dye transfer. *Cytometry* 48, 167-176.
- Takayanagi, H. (2007). Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat. Rev. Immunol* 7, 292-304.
- 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.
- Wong, B. R., Josien, R., Lee, S. Y., Sauter, B., Li, H. L., Steinman, R. M., et Choi, Y. (1997). TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J Exp Med* 186, 2075-80.
- Yang, G., Lian, Z., Kikuchi, K., Liu, Y., Ansari, A. A., Ikehara, S., et Gershwin, M. E. (2005). CD4-plasmacytoid dendritic cells (pDCs) migrate in lymph nodes by CpG inoculation and represent a potent functional subset of pDCs. *J. Immunol* 174, 3197-3203.
- Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., et al. (1998). Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3597-602.
- Yoneyama, H., Matsuno, K., Toda, E., Nishiwaki, T., Matsuo, N., Nakano, A., Narumi, S., Lu, B., Gerard, C., Ishikawa, S., et al. (2005). Plasmacytoid DCs help lymph node DCs to induce anti-HSV CTLs. *J. Exp. Med* 202, 425-435.

## Figures Legend

### Figure 1: TRANCE mRNA expression on DC and pDC subsets.

The expression of TRANCE mRNA was assessed in total mRNA prepared from FACS-sorted spleen DC and pDC and from lymph node cells before and after activation with ConA (A). The expression of TRANCE mRNA was also assessed in total mRNA prepared from the two subsets of pDC at resting state and after maturation in presence of either CpG A or CpG B (B). The results are expressed as a ratio of TRANCE to HPRT mRNA expression and represent the mean  $\pm$  SD of two or three independent experiments. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ . After a positive selection of 85C7+ cells with anti-biotin Microbeads (Miltenyi Biotec), cells were stained with Streptavidine - PerCp Cy 5.5, PE anti-CD45R and AlexaFluor 647 anti-CD4 mAbs. Among the 85C7+ cells, CD45R+ CD4high and CD45R+ CD4low cells were sorted on FACS Aria. Purity was routinely  $>99,5\%$  for both population.

### Figure 2: TRANCE protein detection by cytometry

Freshly FACS sorted CD4high pDC were stained with a polyclonal antibody anti-TRANCE or with a fusion protein OPG-Fc or RANK-Fc between OPG or RANK and a human Fc fragment. A secondary antibody was then used to reveal them (A). Lymph node cells freshly prepared or after activation in presence of ConA were stained with RANK-Fc and a FITC coupled anti-human Fc fragment and used as a positive control (B). 20 minutes of pre-incubation of RANK-Fc with soluble TRANCE was done before staining freshly isolated pDC to test the specificity of the fusion protein (C).

### Figure 3: TRANCE expression on DC subsets and various immune cells

(A) Freshly isolated (upper) DC or 24h matured DC with CpG B (lower) were stained with RANK-Fc and a FITC coupled anti-human Fc fragment. (B) Freshly prepared spleen cells were stained with 85C7 antibody and various antibodies to identify different immune cell populations and were also stained with RANK-Fc and a FITC coupled anti-human Fc fragment. (C) Freshly prepared cells from various lymphoid organs were stained with 85C7 and CD4 antibody coupled with fluorochromes to identify pDC and also stained with RANK-Fc and a FITC coupled anti-human Fc fragment.

#### **Figure 4: TRANCE protein expression on pDC**

(A) Freshly and CpG B matured FACS sorted CD4<sup>high</sup> (upper) and CD4<sup>low</sup> (lower) pDC were stained with RANK-Fc and a FITC coupled anti-human Fc fragment. Freshly prepared spleen cells were stained with CD4-PeCy7, CD3-FITC, CD8-FITC, CD11b/c-FITC (clone OX42), CD45R-PE (clone His24), Rank-Fc, Anti-Fc human-Biot and St-AlexaFluor 647, and were then analysed with a cytofluorometer.

#### **Figure 5: Soluble TRANCE production**

Freshly sorted splenic pDC and cDC subsets and lymph node cells were cultured in complete RPMI 1640 medium/10% FCS at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> with CpG B (5µM) and ConA (5µg/mL) respectively. Supernatants were collected and soluble TRANCE was assessed by ELISA test (R&D systems). The detection threshold of the ELISA is 24pg/mL. \*\*\*, p < 0,001.

#### **Figure 6: Osteoclastogenesis mediated by pDC**

According to the protocol described in Materials and methods, bone marrow cells were differentiated in osteoclast and stained for their expression of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) (Leukocyte Acid Phosphatase Assay kit; Sigma). As negative control, no TRANCE was used and as positive control soluble TRANCE (100ng/mL) was used. 200 000 freshly FACS sorted CD4<sup>high</sup> pDC were also used with soluble TRANCE (100ng/mL). These results are representative of 5 independent experiments.

Figure 1

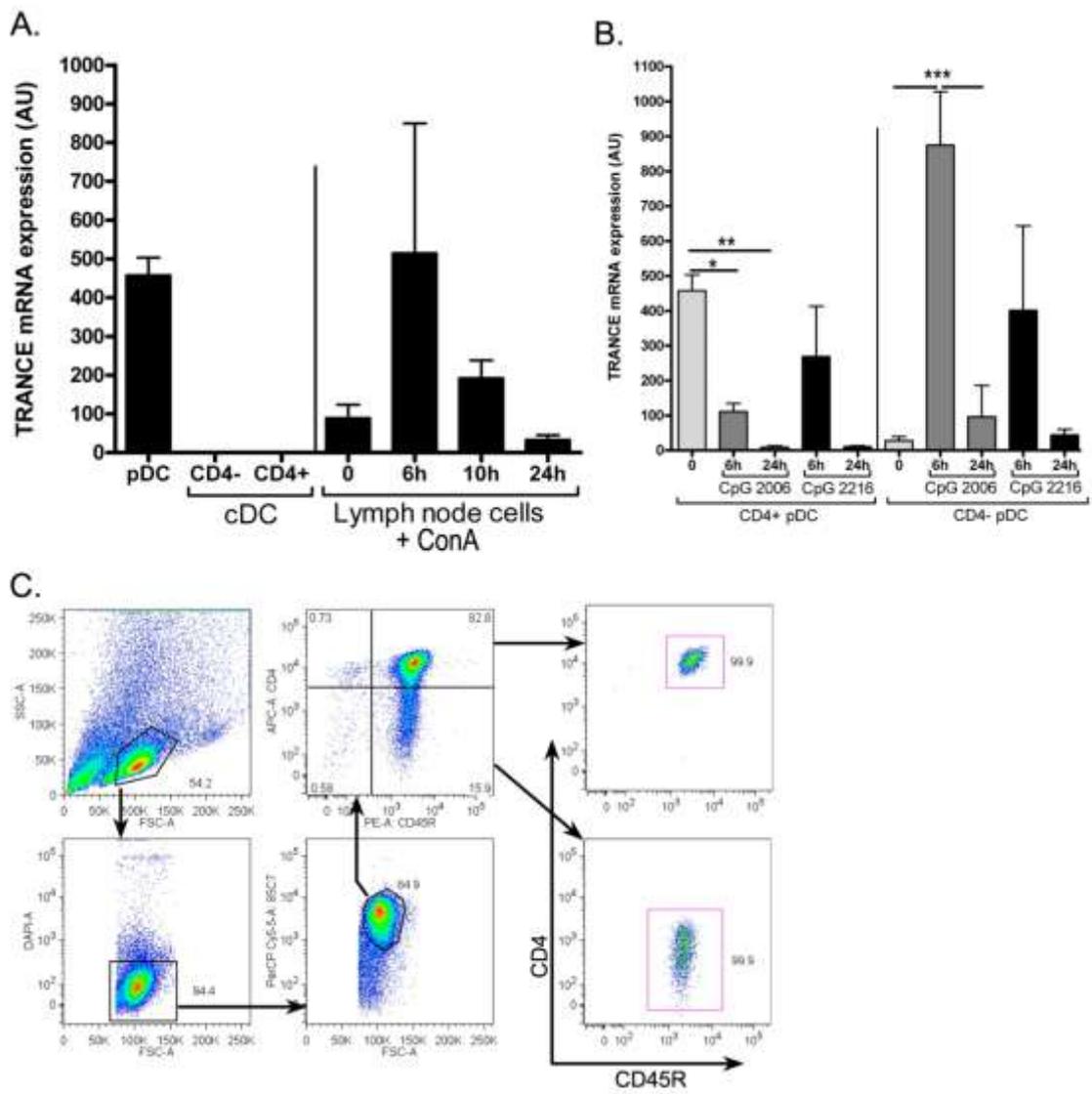


Figure 2

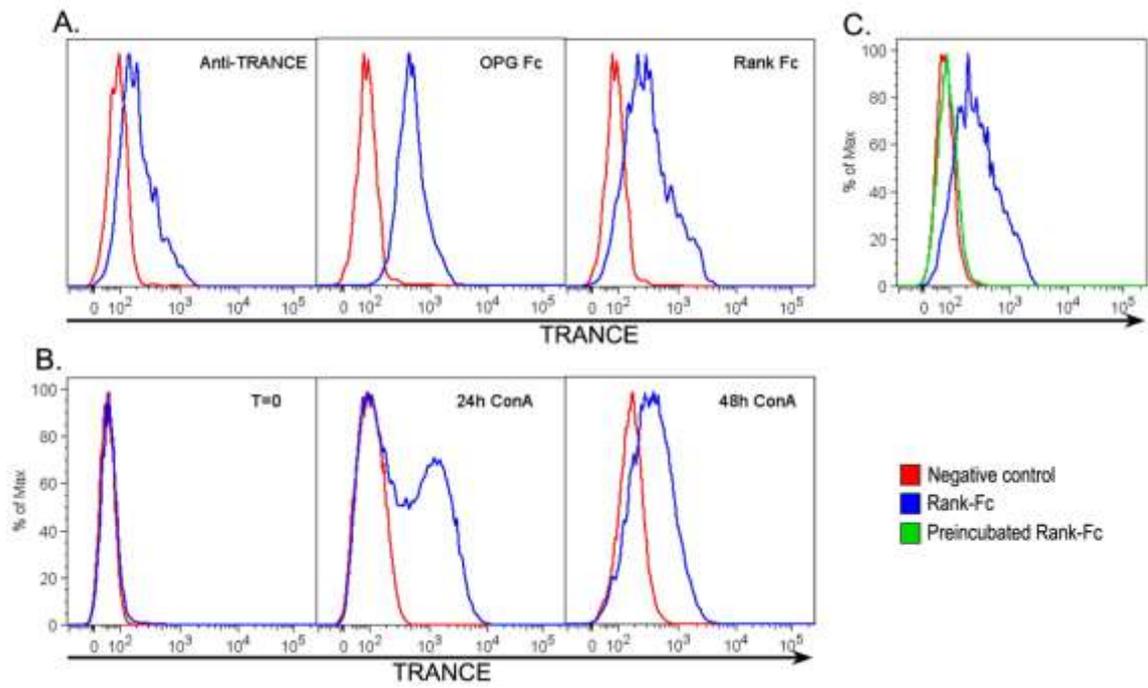


Figure 3

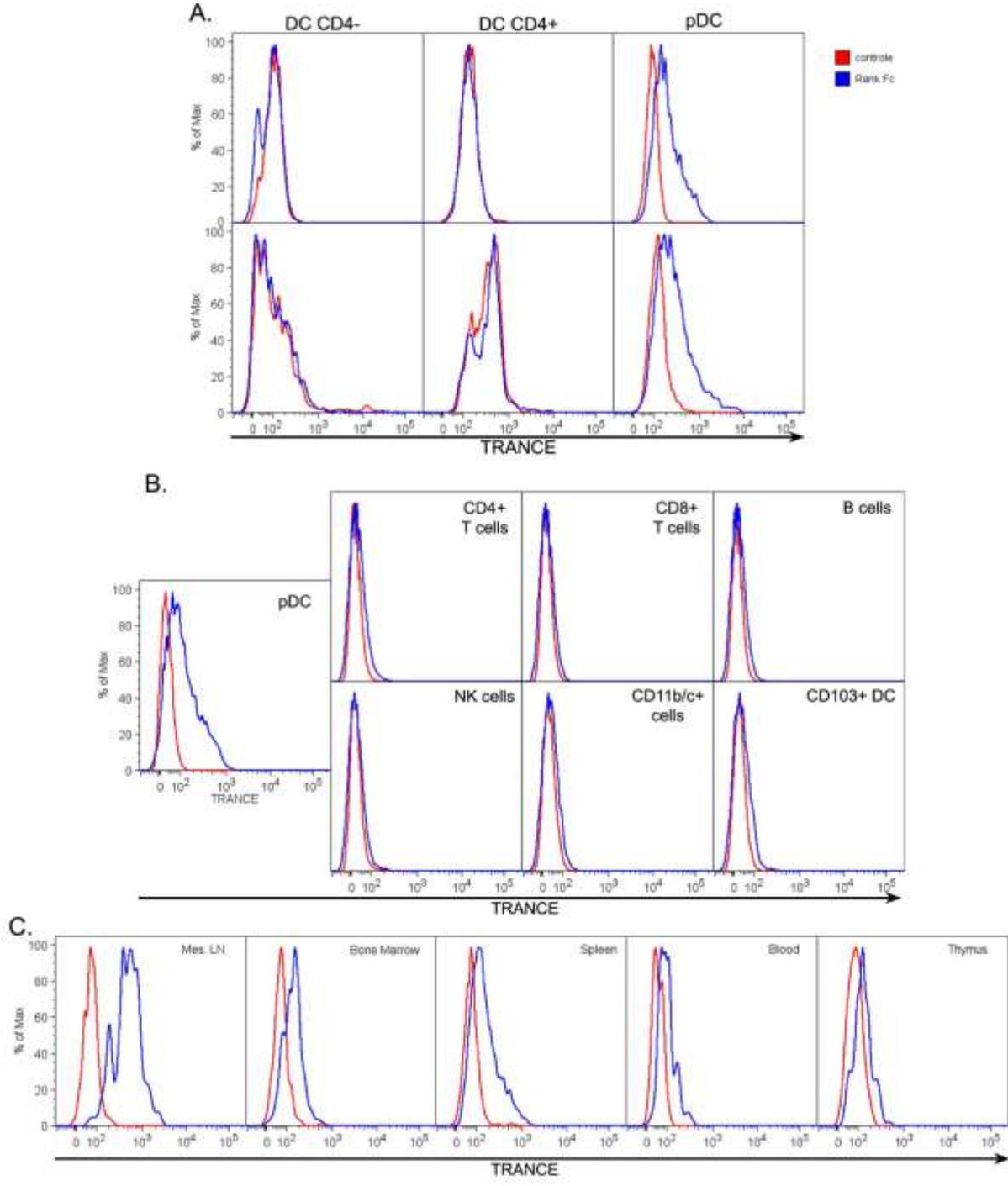


Figure 4

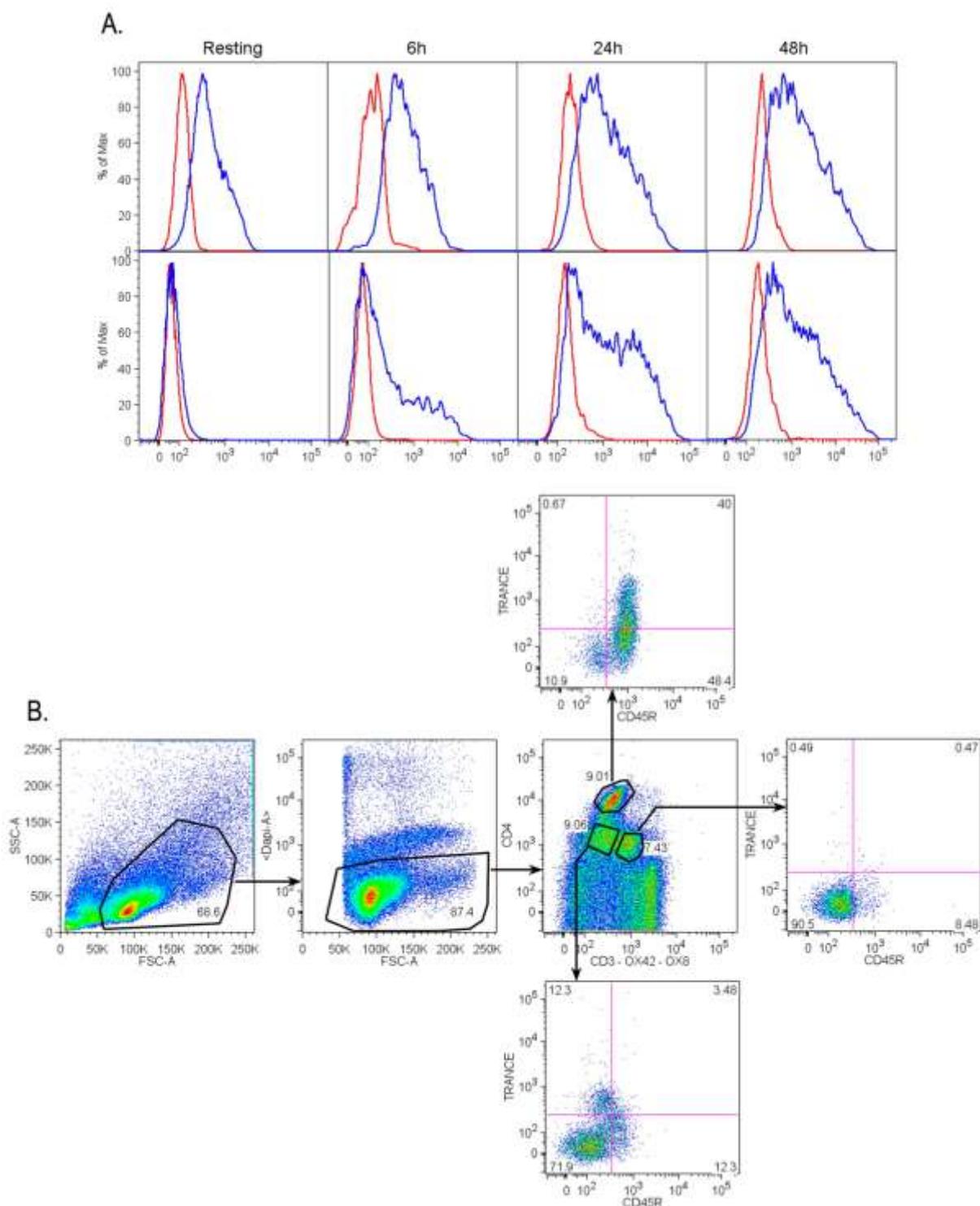


Figure 5

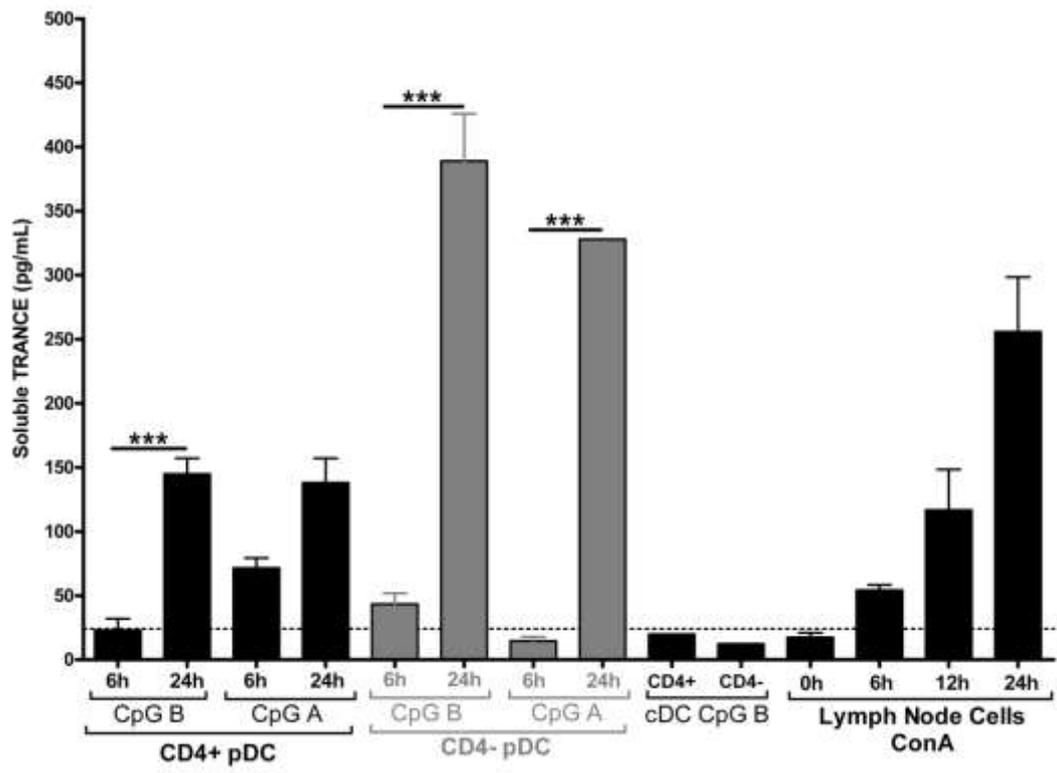
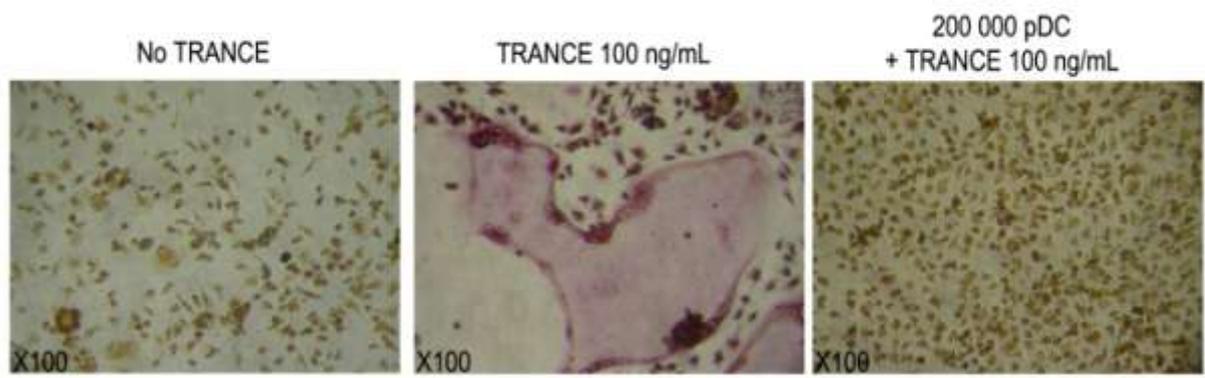


Figure 6

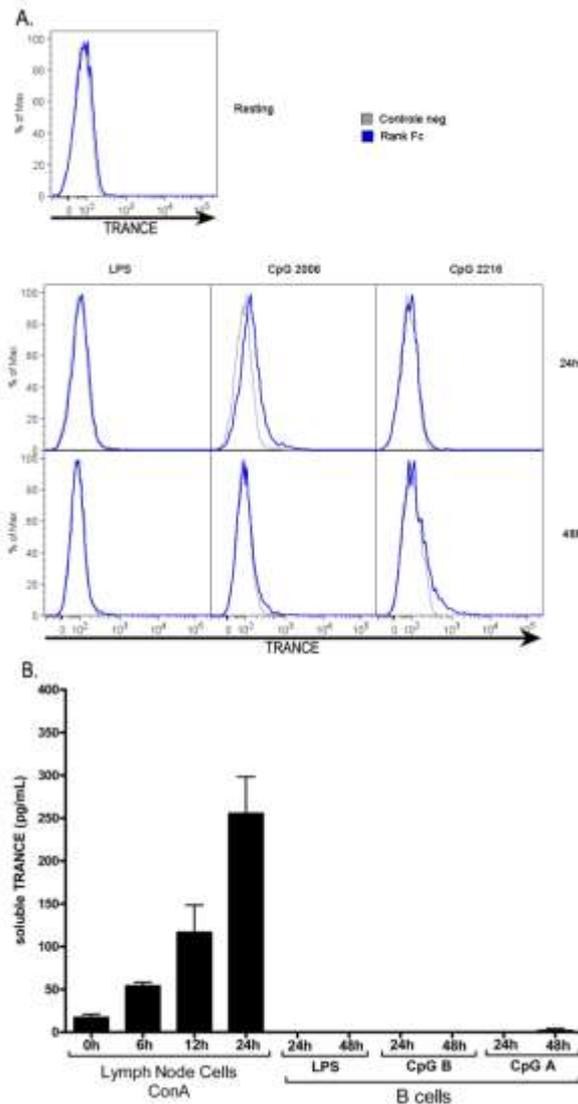


## Résultats complémentaires

### Expression et production de TRANCE par les LB

Chez le rat, nous purifions les pDC avec le CD45R qui est aussi un marqueur des LB. Chez l'homme et la souris, les LB matures, tout comme les LT, ont été décrits comme exprimant TRANCE à leur surface et en produisant sous forme soluble (Kawai et al., 2006). Nous avons donc étudié l'expression de TRANCE par les LB triés suivant leur phénotype 85C7- CD45R+ après déplétion des LT par billes magnétiques Dynal.

Nous n'avons détecté aucune expression de TRANCE sur les LB, aussi bien frais que après maturation 24 ou 48h avec du CpG A ou B ou du LPS (Figure 30A). Nous avons aussi vérifié la production de TRANCE sous forme soluble par ELISA dans les surnageants de culture de LB en présence de LPS, CpG A ou B. Nous n'avons détecté aucune production de TRANCE soluble par les LB quelque soit le stimulus ou le temps de culture testé (Figure 30B).



**Figure 30 - Expression et production de TRANCE par les LB.** (A) Analyse par cytométrie en flux de l'expression de TRANCE sur des LB fraîchement triés ou après maturation 24h ou 48h en présence de LPS, CpG 2006 (CpG B) et CpG 2216 (CpG A). (B) Production de TRANCE soluble analysée par ELISA dans les surnageants de culture de cellules ganglionnaires après 6h, 12h et 24h d'activation en présence de Concanavoline A, ainsi que dans des surnageants de stimulation de LB triés et maturés 24h ou 48h en présence de LPS, CpG A ou CpG B. Le temps 0 correspond au milieu de culture seul utilisé.

### Analyse de l'expression de TRANCE chez la souris

La souris est un modèle d'étude très intéressant car disposant de nombreux outils qui n'existent pas chez le rat, comme par exemple des souris déficiente pour le gène TRANCE. Ces souris pourraient nous permettre d'étudier plus en détail la fonction in-vitro et in-vivo des pDC exprimant ou non TRANCE. Nous avons donc vérifié si les résultats obtenus chez le rat étaient reproductibles chez la souris. Nous avons utilisé des souris CBA qui sont connues pour être plus riche en pDC.

**Protocole de purification des cellules :** A partir de 8 souris CBA femelles de 8 semaines, les rates sont prélevées stérilement, digérées à la collagénase D (Roche Diagnostics) puis dilacérées. Après Ficoll, les cellules sont marquées par des Ac monoclonaux spécifiques de CD3 et CD19. Les cellules CD3<sup>+</sup> et CD19<sup>+</sup> sont déplétées par billes magnétiques anti-IgG de rat (Dyna). Les cellules sont ensuite marquées par différents Ac couplés à des fluorochromes : CD3-PE, CD19-PE, TER119-PE, CD4-Pacific Blue, CD11c-FITC et CD45R-PerCpCy5.5 (Clone B220). Les cellules sont ensuite triées sur un Facs Aria comme présenté dans la Figure 31A. On purifie ainsi les cellules CD11c<sup>+</sup> CD45R<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> ou CD4<sup>-</sup> après avoir exclus les cellules marquées en PE. La pureté est supérieure à 97%.

Les cellules ganglionnaires sont quant à elles obtenues après dilacération et filtrage des ganglions mésentériques.

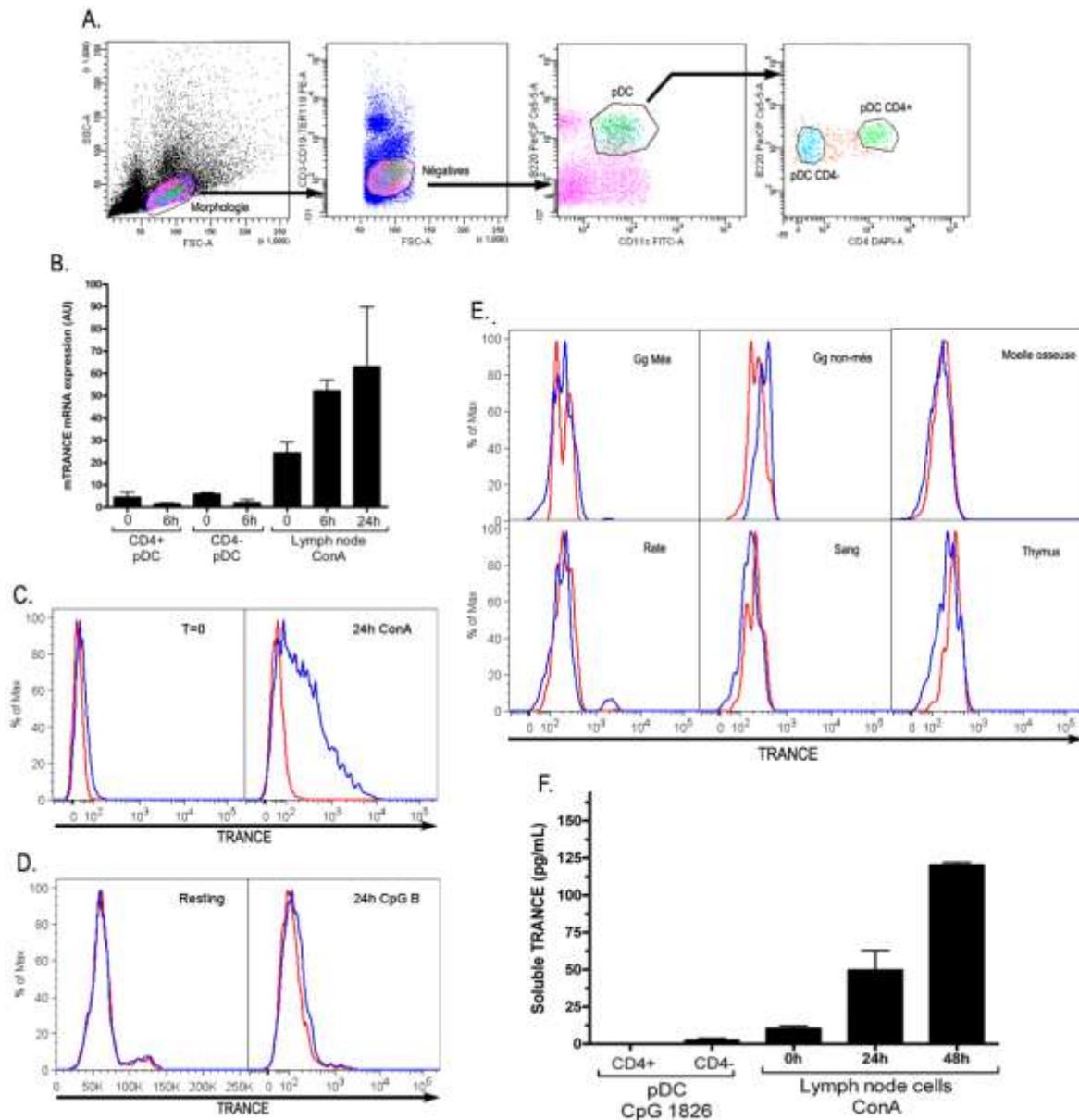
Les cellules sont ensuite congelées fraîches dans du trizol ou bien après 24h de culture en milieu RPMI complet en présence de Concanavoline A (ConA) pour les cellules ganglionnaires et de GM-CSF (10ng/mL), rmlL-3 (10ng/mL) et CpG 1826 (5 $\mu$ M) pour les pDC. Les ARN sont ensuite extraits et rétro-transcrits pour pouvoir être utilisés en PCR quantitative en temps réel.

## Résultats

La première étape a été de vérifier l'expression du gène codant TRANCE dans les pDC et les lymphocytes T activés, utilisés comme contrôle positif, par PCR quantitative en temps réel. Les primers utilisés pour amplifier le gène TRANCE chez la souris par PCR sont : mTRANCE Up : CACACCTCACCATCAATGCTG et mTRANCE Lo : AGAATTGCCCGACCAGTTTT. Les cellules ganglionnaires, riche en LT, surexpriment l'ARNm TRANCE après activation par la ConA, ce qui corrèle avec les résultats obtenus chez le rat. On peut toutefois noter que les valeurs, exprimées en unités arbitraires, sont nettement plus faibles que chez le rat. L'ARNm TRANCE n'est pas détecté dans les pDC CD4<sup>+</sup> et CD4<sup>-</sup> de souris, fraîches ou maturés 6h en présence de CpG B (Figure 31B). Nous avons tout de même vérifié l'expression de la protéine TRANCE à la surface des pDC de souris par cytométrie en flux. L'expression de TRANCE à la surface des cellules spléniques B220<sup>+</sup> mpDCA1<sup>+</sup>, correspondant aux pDC, a été analysée en utilisant différents anticorps monoclonaux et un polyclonal dirigés contre la protéine de TRANCE de souris, ainsi que la protéine de fusion Rank-Fc. Les cellules ganglionnaires, après maturation en présence de ConA, expriment la protéine TRANCE à

leur surface, comme mis en évidence par Rank-Fc dans la Figure 31C. Aucune expression membranaire de la protéine TRANCE n'a été détecté sur les pDC spléniques fraîches ou maturées 24h en présence de CpG B (Figure 31D). Cette absence d'expression membranaire a également été observée sur les pDC de souris extraites des ganglions mésentériques et non-mésentériques, de la moelle osseuse, du sang et du thymus (Figure 31E). Concernant la forme soluble de la protéine, elle a pu être mise en évidence par le même ELISA utilisé chez le rat dans les surnageants de culture de cellules ganglionnaires en présence de ConA. Les surnageants de 24h de culture de pDC CD4+ et CD4- en présence de CpG 1826 ne contiennent pas de forme soluble de TRANCE (Figure 31F).

Les observations faites sur les pDC de rat ne sont pas confirmées chez la souris.

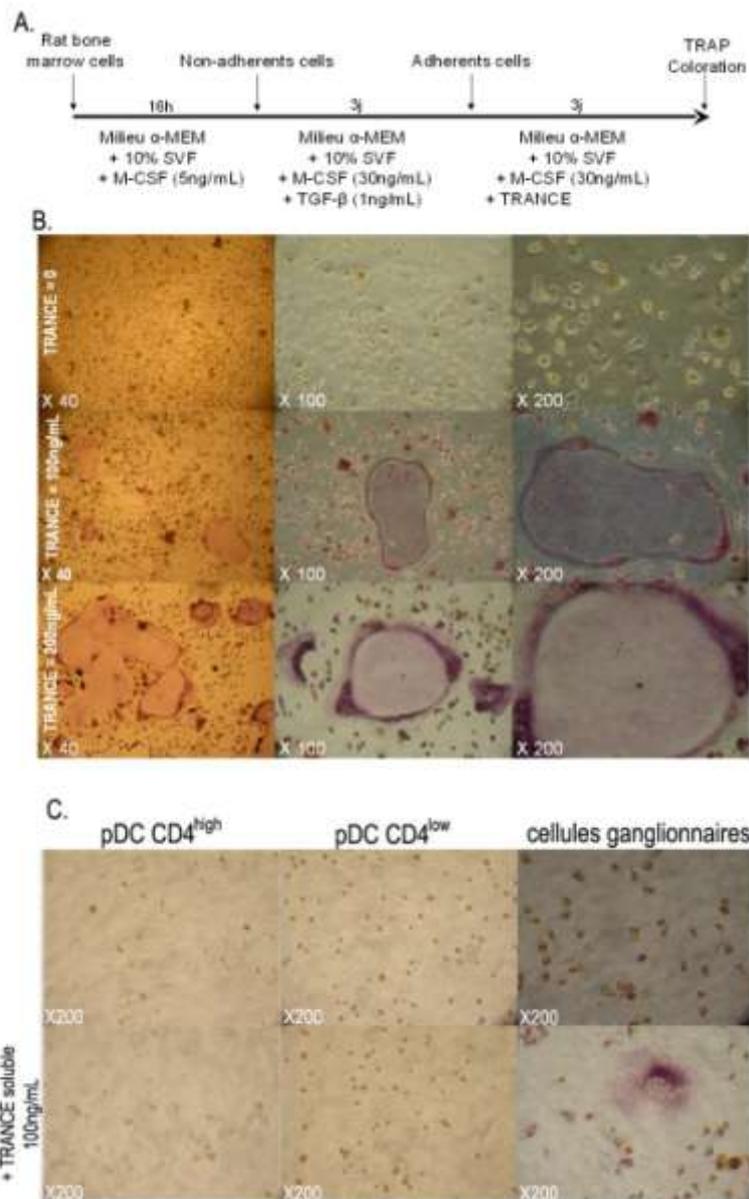


**Figure 31 - Analyse de l'expression de TRANCE chez la souris.** (A) Méthode de purification par cytométrie en flux des populations de pDC CD4+/- chez la souris à partir de cellules spléniques murines. (B) Expression de l'ARNm TRANCE dans les populations de pDC CD4+ et CD4- fraîchement triées ou après maturation 6h en présence de CpG B, ainsi que dans des cellules ganglionnaires fraîchement préparées ou après 6h et 24h d'activation en présence de Concanavoline A chez la souris. (C) Expression de la protéine TRANCE par cytométrie en flux dans des cellules ganglionnaires fraîchement préparées ou après 24h d'activation en présence de Concanavoline A chez la souris. (D) Expression de la protéine TRANCE par cytométrie en flux dans des pDC fraîchement triées ou après 24h de maturation en présence de CpG B chez la souris. (E) Expression de la protéine TRANCE par cytométrie en flux dans des pDC fraîchement triées issues de ganglions mésentériques ou non, de la moelle osseuse, de la rate, du sang ou bien du thymus chez la souris. (F) Production de TRANCE soluble analysée par ELISA dans les surnageants de 24h de culture de pDC en présence de CpG 1826 (CpG B), ou bien de 24h et 48h de stimulation de cellules ganglionnaires en présence de Concanavoline A. Le temps 0 correspond au milieu de culture seul utilisé.

## Ostéoclastogénèse médiée par les pDC

TRANCE est largement connu pour son rôle essentiel dans l'ostéoclastogénèse. En effet, en absence de TRANCE il ne peut y avoir formation d'ostéoclastes. De plus, des modèles d'ostéoclastogénèse médiés par des LT et des LB ont été décrits (Kawai et al., 2006). Nous avons donc cherchés à savoir si l'expression et la production de TRANCE par les pDC pouvait avoir un rôle ostéoclastogénique. Cela prouverait également que cette expression de TRANCE par les pDC de rat a un rôle fonctionnel.

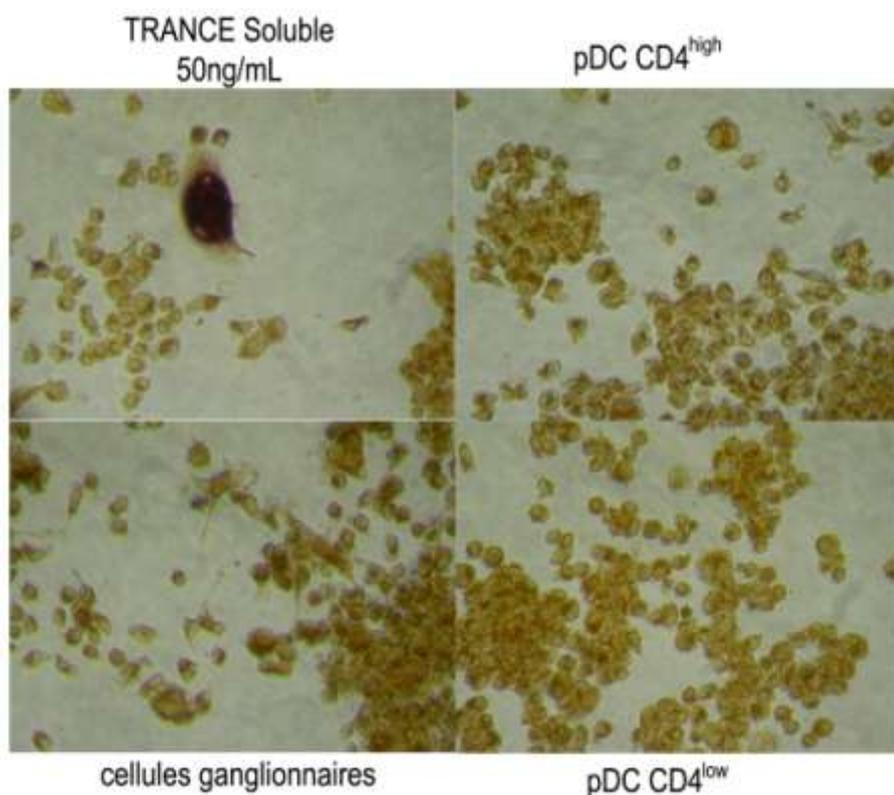
**Modèle d'ostéoclastogénèse à partir de cellules de la moelle osseuse :** A partir de cellules de la moelle osseuse et suivant le protocole décrit en Figure 32A, nous avons cherché à induire des ostéoclastes en présence de TRANCE soluble à différentes concentrations. Dès 100ng/mL de TRANCE soluble pendant les 3 derniers jours de culture, on observe la formation d'ostéoclastes dont la taille est proportionnelle à la quantité de TRANCE soluble utilisée (Figure 32B). A partir de 10ng/mL, on n'observe plus de formation d'ostéoclastes. Nous avons ensuite testé en ajoutant des pDC CD4<sup>high</sup> stimulées 3h en présence de CpG 2006 afin qu'elles survivent plus longtemps. Mais comme présenté dans l'article 2, en présence des pDC CD4<sup>high</sup>, avec ou sans ajout de TRANCE soluble, l'ostéoclastogénèse est entièrement inhibée. Le même résultat est observé avec des pDC CD4<sup>high</sup> fraîches. Pour éviter que des facteurs solubles produits par les pDC ne bloquent totalement la formation des ostéoclastes, nous avons fixé les pDC avec du paraformaldéhyde (PFA) avant de les placer en présence des précurseurs d'ostéoclastes. Cette méthode ayant été décrite avec des LT et des LB fixés chez l'homme comme pouvant induire des ostéoclastes (Kawai et al., 2006). Nous avons donc fixés des pDC CD4<sup>high</sup> et CD4<sup>low</sup> après maturation 24h en présence de CpG B et après vérification par cytométrie en flux de leur expression de TRANCE à leur surface. Nous avons également fixés des cellules ganglionnaires après 24h de cultures en présence de ConA pour obtenir des LT activés dont l'expression membranaire de TRANCE a également été vérifiée par cytométrie en flux juste avant la fixation. Les deux populations de pDC fixées, en présence ou non de TRANCE soluble, n'induisent pas la formation d'ostéoclastes. Les LT activés et fixés n'induisent pas non plus d'ostéoclastes. Contrairement aux pDC, les LT fixés n'inhibent pas la formation des ostéoclastes en présence de TRANCE soluble (Figure 32C).



**Figure 32 - Modèle d'ostéoclastogénèse à partir de cellules de la moelle osseuse.** (A) Protocole de différenciation de précurseurs de la moelle osseuse en ostéoclastes. (B) Résultats de la différenciation de précurseurs de la moelle osseuse en utilisant le protocole décrit en (A) en absence de TRANCE soluble ou bien en présence de 100 ou 200 ng/mL de TRANCE soluble lors des 3 derniers jours de différenciation et après coloration TRAP. (C) Résultats de la différenciation de précurseurs de la moelle osseuse en utilisant le protocole décrit en (A) en présence de 100 000 pDC CD4<sup>high</sup>, CD4<sup>low</sup> et de cellules ganglionnaires préalablement stimulées 24h en présence de CpG B pour les pDC et de Concanavaline A pour les cellules ganglionnaires puis fixées 15 min en présence de PFA 2%, avec ou sans ajout de 100 ng/mL de TRANCE soluble lors des 3 derniers jours de différenciation et après coloration TRAP.

**Modèle d'ostéoclastogénèse à partir de la lignée 4B12 :** La lignée de cellules 4B12, issue de cellules de la calvaria d'embryons de souris, se différencie en ostéoclastes en présence de TRANCE soluble (Amano et al., 2009). Les cellules sont cultivées 14 jours en présence de 50ng/mL de TRANCE soluble et de 10ng/mL de M-CSF. Nous avons donc testé avec 1000 ou

2000 cellules 4B12 dans un puits de plaque 96 puits à fond plat pendant 14 jours avec différentes quantités de pDC fixées après 24h de stimulation en présence de CpG B. Nous avons également testé avec des LT fixés après activation en présence de ConA. En présence de TRANCE soluble, nous observons une formation d'ostéoclaste très faible. On observe en effet seulement la formation de cellules multinucléées TRAP+. Nous avons également testé avec différentes quantités de cellules fixées mais quelque soit les cellules utilisées (pDC CD4<sup>high</sup>, pDC CD4<sup>low</sup> et LT) nous n'avons pas pu induire la formation d'ostéoclastes (Figure 33).



**Figure 33 - Modèle d'ostéoclastogénèse à partir de la lignée cellulaire 4B12.** Résultats de 14 jours de culture de 2000 cellules de la lignée 4B12 dans des puits de plaques 96 puits à fond plat en présence de TRANCE soluble (50 ng/mL), de 10 000 pDC CD4<sup>high</sup> ou CD4<sup>low</sup> stimulées 24h en présence de CpG B puis fixées 15 min avec du PFA 2%, ou encore en présence de cellules ganglionnaires stimulées 24h en présence de Concanavalline A puis fixées 15 min avec du PFA 2%. Les puits sont ensuite colorés par coloration TRAP.

---

# Discussion

---

Les DC sont des cellules présentatrices d'antigènes possédant la capacité de capturer et de présenter des antigènes aux lymphocytes T naïfs conduisant ainsi au développement de réponses immunes adaptatives. Notre équipe a caractérisé les sous-populations de DC spléniques chez le rat et a également identifié l'équivalent des DC plasmacytoïdes chez le rat. L'implication des pDC étant de plus en plus décrite en pathologie, aussi bien virale, qu'autoimmune et cancéreuse, leur étude phénotypique et fonctionnelle s'en trouve également abondamment décrite. Il en résulte la découverte de sous-populations de pDC chez la souris et l'homme. Chez l'homme, ces sous-populations de pDC semblent jouer des rôles pathologiques différents, ce qui rend leur étude d'autant plus importante.

L'étude des pDC chez le rat n'a jusque là pas permis la caractérisation de sous-populations de pDC. La génération d'un Ac monoclonal, appelé 85C7, reconnaissant les pDC, CD11b- CD103- CD4<sup>high</sup> CD45R+ de rat a de manière inattendue révélé une population de cellules CD11b- CD103- CD45R+ CD4<sup>low</sup>. Nous avons donc étudié en détail par la suite cette population afin de définir sa morphologie, son phénotype et sa fonction dans le but de déterminer s'il s'agissait d'une nouvelle population de cellules dendritiques plasmacytoïdes.

### **Caractérisation de sous-populations de pDC chez le rat**

Afin de faciliter la purification et l'étude des pDC de rat, notre équipe a généré le premier Ac monoclonal dirigé contre les pDC spléniques de rat. Cet Ac, baptisé 85C7, permet une purification plus efficace des pDC de rat. En effet, les cellules reconnues par cet Ac expriment toutes CD45R et sont à 95% CD4+, ce qui correspond au phénotype des pDC précédemment décrites chez le rat par notre équipe (Hubert et al., 2004). Une autre observation confortant la spécificité de cet Ac pour les pDC est que les cellules 85C7+ sont à 96% Siglec-H+. Siglec-H, un récepteur d'endocytose, est un marqueur connu des pDC chez la souris (Blasius et al., 2006). L'Ac 85C7 est désormais utilisé en routine dans notre laboratoire pour la purification des pDC 85C7+ CD45R+ CD4<sup>high</sup> de rat. Au début de son utilisation en tri cellulaire par cytométrie, nous avons observé, parmi les cellules 85C7+, une population de cellules CD45R+ CD4<sup>low</sup>, représentant 20 % des cellules 85C7+ spléniques. Cette population n'est pas spécifique de la souche de rat utilisée (Lewis). En effet, elle est aussi retrouvée chez les rats de souche Sprague-Dawley. Chez l'homme et la souris, des

sous-populations de pDC ont déjà été décrites comme je l'ai présenté dans l'introduction de ce manuscrit. Chez la souris notamment, on connaît deux populations de pDC se différenciant par leur expression du CD4 (Yang et al., 2005). Les pDC CD4<sup>-</sup> de souris semblent être en première ligne de défense lors d'infections virales alors que les pDC CD4<sup>+</sup> répondent moins aux ligands de TLR. L'existence de ces deux populations de pDC chez la souris a fait pointer l'idée que cette population 85C7<sup>+</sup> CD45R<sup>+</sup> CD4<sup>low</sup> pourrait correspondre à une population de pDC. La première partie de mon projet de thèse se consacre donc à la caractérisation de cette population afin de déterminer s'il s'agit ou non d'une population de pDC.

La cible du 85C7 n'est pour l'instant pas encore identifiée. L'anticorps ne fonctionne pas en immunohistochimie. Nous essayons actuellement d'isoler la cible par immunoprécipitation pour ensuite l'isoler sur gel d'agarose et la faire séquencer. Nous saurons ainsi, par alignement de la séquence obtenue, si la protéine que reconnaît le 85C7 est identifiée chez le rat. Si ce n'est pas le cas, nous trouverons probablement des équivalents chez l'homme ou la souris. Ainsi nous pourrions déterminer ou du moins supposer la cible du 85C7, et ainsi identifier une molécule comme marqueur des pDC de rat.

D'un point de vue morphologique, comme décrit par Yong-Jun Liu en 2005 (Liu, 2005), après coloration au MGG, les pDC ont un noyau excentré en forme de rein, ce qui est le cas des pDC CD4<sup>high</sup>, mais également des cellules 85C7<sup>+</sup> CD45R<sup>+</sup> CD4<sup>low</sup>. Dans cette même revue, en microscopie électronique à transmission (MET), Y-J Liu décrit leur noyau avec l'hétérochromatine marginale et un cytoplasme contenant un réticulum endoplasmique rugueux développé, servant à leur énorme production d'IFN $\alpha$ , et de nombreuses mitochondries, fournissant l'énergie nécessaire à cette production. Cette description correspond tout à fait aux cellules 85C7<sup>+</sup> CD45R<sup>+</sup> CD4<sup>low</sup> observées en MET, ce qui est un premier argument supposant que les cellules 85C7<sup>+</sup> CD45R<sup>+</sup> CD4<sup>low</sup> pourrait être des pDC.

Les pDC ont un phénotype différent suivant leur origine (homme, souris, rat). Ainsi, les pDC humaines sont caractérisées par leur expression de BDCA2, BDCA4 et CD123 (Dzionek et al., 2000, 2001b). Chez la souris elles sont caractérisées par leur expression du Siglec-H (Zhang et al., 2006), Ly6-C (Asselin-Paturel et al., 2001b), BST-2 (Cao et al., 2009) et 120G8 (Asselin-Paturel et al., 2003). Chez le rat, leur étude est encore peu répandue et aucun marqueur spécifique n'a pour l'instant été identifié. Elles ont toutefois un phénotype CD11c<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> CMH II<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> qui est commun aux pDC des trois espèces. Même si une faible expression du CD8 et du CD11c est retrouvé chez les pDC de souris. Chez le rat, les pDC

sont également CD103- et CD45R+ (Hubert et al., 2004). Les cellules 85C7 partagent en grande partie ce phénotype. En effet elles sont CD11b- CD8- CD103- CD45R+. Leur expression membranaire des molécules du CMH II est néanmoins plus faible, ce qui pourrait suggérer que ces cellules ont une moindre capacité de présentation des peptides exogènes. Capacité déjà décrite comme faible chez les pDC (LeibundGut-Landmann et al., 2004). Comparativement aux pDC CD4<sup>high</sup>, les cellules 85C7+ CD4<sup>low</sup> expriment faiblement le CD161 (NKR-P1). NKR-P1 est exprimé chez le rat par les cellules NK, où il joue un rôle activateur ou inhibiteur de leur activité cytotoxique, et par les cDC, entraînant une activité cytolytique spécifique contre certaines lignées tumorales (Bezouska et al., 1994; Josien et al., 1997). Notre équipe a démontré que les DC CD4-, contrairement aux DC CD4+, ont un pouvoir cytolytique. En effet, elles sont capables de tuer certaines lignées cellulaires comme les YAC-1 et les K562 (Trinite et al., 2000). Contrairement aux pDC CD4<sup>low</sup>, les pDC CD4<sup>high</sup> étant CD161+, elles ont peut-être une activité cytotoxique. Afin de déterminer ce potentiel rôle, d'autres tests de cytotoxicité pourront donc être réalisés contre différentes lignées cibles. Les pDC CD4<sup>high</sup> expriment également de manière très variable le CD90 (Thy-1) alors que les cellules 85C7+ CD4<sup>low</sup> l'expriment toutes fortement. Le CD90, une molécule d'adhésion, est exprimé par les fibroblastes et les neurones (Fields et al., 1978). C'est aussi un marqueur de différenciation exprimé par les thymocytes et les LT (Seki et al., 1985). Cette expression différente entre les deux populations de cellules 85C7+ pourrait suggérer un état de différenciation différent et donc que ce ne serait pas deux populations différentes mais l'une précurseur de l'autre. Un autre argument allant dans ce sens est la répartition différente des deux populations au sein de l'organisme. En effet, les cellules 85C7 CD4<sup>low</sup> sont retrouvées principalement dans la moelle osseuse et le sang alors que les pDC CD4<sup>high</sup> sont retrouvées principalement dans la rate et les ganglions lymphatiques. Cette répartition laisse fortement penser aux cellules 85C7 CD4<sup>low</sup> comme un précurseur hématopoïétique des pDC CD4<sup>high</sup> qui achèverait sa différenciation en périphérie. Or l'étude du phénotype des cellules 85C7+ CD4<sup>low</sup> après maturation in-vitro par des ligands de TLR montre qu'elles ne surexpriment pas le CD4. De plus, après maturation elles expriment TRANCE à leur surface, or les pDC CD4<sup>high</sup> expriment TRANCE à l'état non activé, au repos. Les cellules 85C7 CD4<sup>low</sup> ne peuvent donc pas être les précurseurs des pDC CD4<sup>high</sup>, dans un contexte in-vitro en tout cas. Leur devenir in-vivo est peut-être différent, avec les facteurs dont elles pourraient avoir besoin pour achever leur différenciation sans maturation. Mais cette hypothèse est contrecarrée par l'observation

que les pDC CD4<sup>high</sup> diminuent leur expression du CD4 après maturation, laissant penser au contraire, que ce serait les pDC CD4<sup>high</sup> les précurseurs des cellules 85C7+ CD4<sup>low</sup>. Mais la simple observation de l'expression de la protéine TRANCE par les pDC CD4<sup>high</sup> infirme cette hypothèse. En effet, les pDC expriment TRANCE de manière constitutive et également après maturation. Les cellules 85C7+ CD4<sup>low</sup> n'expriment pas TRANCE au repos. Les pDC CD4<sup>high</sup> ne semblent donc pas pouvoir se différencier en cellules 85C7+ CD4<sup>low</sup>. A noter également que les deux populations ne présentent aucun pouvoir de prolifération particulier. Ces observations suggèrent fortement que ces deux populations sont distinctes l'une de l'autre.

Le facteur de transcription E2-2 a été décrit comme contrôlant spécifiquement le développement des pDC (Cisse et al., 2008b). Les cellules 85C7 CD4<sup>low</sup> exprimant l'ARNm E2-2 à un niveau identique que celui des pDC, cela renforce fortement notre hypothèse que les deux populations seraient des pDC.

En réponse à des ligands de TLR, les deux populations produisent les mêmes cytokines. On remarque toutefois que les cellules 85C7+ CD4<sup>low</sup> produisent ces cytokines en quantité plus importantes. On observe tout d'abord qu'en réponse à un ligand de TLR4, les pDC CD4<sup>high</sup> et les cellules 85C7+ CD4<sup>low</sup> ne produisent aucune des cytokines quantifiées, suggérant une expression faible du TLR4 dans les deux populations, ce qui est déjà connu pour les pDC CD4<sup>high</sup> (Hubert et al., 2004). En réponse à des ligands de TLR 7 et 9, les pDC CD4<sup>high</sup> ne produisent pas de manière significative de GM-CSF et de TNF- $\alpha$ . Les cellules 85C7+ CD4<sup>low</sup> en produisent, quant à elles, une quantité non négligeable. Le GM-CSF est un facteur de croissance hématopoïétique qui assure le développement des neutrophiles (Dang et al., 2006; Atzeni et al., 2002), des macrophages (Caulfield et al., 1997), des granulocytes et la prolifération et le développement des progéniteurs éosinophiles, mégacaryocytaires et érythroïdes. Les cellules 85C7+ CD4<sup>low</sup> étant prédominantes dans la moelle osseuse par rapport aux pDC CD4<sup>high</sup>, elles pourraient jouer un rôle localement lors d'une infection virale et induire le développement de macrophages et de neutrophiles. Cela entraînerait ainsi une réponse antivirale et l'établissement local d'un site inflammatoire avec leur production de TNF- $\alpha$ , une cytokine pro-inflammatoire pléiotropique, et leur forte production d'IL-6. A noter qu'une forte production d'IL-6 est une caractéristique connue des pDC, ce qui fait un argument supplémentaire pour qualifier les cellules 85C7+ CD4<sup>low</sup> de pDC. Cette production d'IL-6, en synergie avec l'IL-3 produit par les LT et les éosinophiles, favorise le développement des mégacaryocytes (Imai et al., 1991), potentialisant ainsi l'effet du GM-CSF. Les cellules 85C7+ CD4<sup>low</sup> produisent également du GRO-KC (Cxcl1), une

chimiokine attirant les neutrophiles et les activant dans un contexte inflammatoire. Les neutrophiles attirés seront donc activés par le site inflammatoire local induit par les pDC CD4<sup>low</sup>. De plus, il a été décrit que les neutrophiles convertissent la pro-chémérine, peu active, en chémérine active (Wittamer et al., 2005). Cette chimiokine est l'une des seules attirant les pDC. Ce recrutement supplémentaire de pDC sur le site de l'inflammation, initié par les cellules 85C7+ CD4<sup>low</sup> amplifierait donc leur réponse antivirale précoce, agissant comme une boucle autocrine de recrutement et d'activation.

Parmi les cytokines produites par les pDC CD4<sup>high</sup> et les cellules 85C7+ CD4<sup>low</sup>, on trouve également MIP-1 $\alpha/\beta$ , un chimio-attractant des LT CD8+ (Taub et al., 1993), et Rantes, qui lui attire les LT mémoires (Hvas et al., 1997). L'attraction de ces LT sur le site de l'inflammation ajoute un niveau supplémentaire de défense lors d'une infection virale. Tous ces éléments feraient des cellules 85C7+ CD4<sup>low</sup> des sentinelles de choix très efficaces en cas d'infections virales dans la moelle osseuse ou le sang.

Mais cette description seulement basée sur la morphologie, le phénotype des cellules et les cytokines qu'elles produisent n'est pas suffisante pour qualifier les cellules 85C7+ CD4<sup>low</sup> de pDC. Une preuve indiscutable serait bien-sûr la production très importante d'IFN $\alpha$  par ces cellules. En effet, cette production est la caractéristique première des pDC. Nous avons donc cherché à mettre en évidence si cette nouvelle population produisait de l'IFN $\alpha$ . Au niveau génomique, l'expression de l'ARNm codant l'IFN $\alpha$  par les cellules 85C7+ CD4<sup>low</sup> en réponse à un ligand de TLR9 est indiscutable et même supérieure à l'expression de cet ARNm par les pDC CD4<sup>high</sup>. Le niveau d'induction d'expression de cet ARNm est toutefois supérieur chez les pDC CD4<sup>high</sup>. En cytométrie en flux, malgré les nombreux Ac testés, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence l'expression de l'IFN $\alpha$ . Ceci est très certainement dû à un problème de spécificité des Ac utilisés. Toutefois, l'expression de l'ARNm IFN $\alpha$  renforce fortement l'hypothèse selon laquelle les cellules 85C7+ CD4<sup>low</sup> seraient des pDC. Une méthode alternative à la cytométrie pour déterminer si les deux populations produisent bien de l'IFN $\alpha$  sous forme protéique serait de réaliser un test fonctionnel qui nous permettrait de quantifier la production d'IFN $\alpha$  par les cellules 85C7+ CD4<sup>low</sup>.

Les pDC sont des cellules présentatrices d'antigènes capables d'induire la prolifération des LT naïfs. Cette fonction est indispensable pour pouvoir qualifier les cellules 85C7+ CD4<sup>low</sup> de cellules dendritiques. Il apparait à la vue des résultats que les cellules 85C7+ CD4<sup>low</sup> sont effectivement capables d'induire la prolifération de LT effecteurs naïfs, prolifération deux fois

supérieure à celle induite par les pDC CD4<sup>high</sup>. Ces résultats permettent aussi de voir que les cellules 85C7+ CD4<sup>low</sup> répondent aux ligands de TLR7 et 9 principalement, tout comme les pDC CD4<sup>high</sup>. Notre équipe a précédemment décrit que les pDC CD4<sup>high</sup> chez le rat inhibaient la suppression de la prolifération des LT<sub>eff</sub> induite par les LT<sub>reg</sub> (Ouabed et al., 2008). Les cellules 85C7+ CD4<sup>low</sup> présentent exactement la même propriété.

Tous ces résultats, ajoutés aux preuves morphologiques, phénotypiques et au profil de cytokines produites, prouvent clairement que les cellules 85C7+ CD4<sup>low</sup> sont des pDC. On les nommera donc pDC CD4<sup>low</sup> pour les différencier des pDC CD4<sup>high</sup>.

Ces deux populations apparaissent distinctes des deux populations de pDC CD4<sup>+</sup> et CD4<sup>-</sup> de la souris (Yang et al., 2005). En effet, chez la souris, les pDC CD4<sup>+</sup> ne perdent pas leur expression du CD4 après maturation. Or chez le rat, les pDC CD4<sup>high</sup> diminuent leur expression du CD4 après maturation. De plus, les pDC CD4<sup>-</sup> de la souris sont prépondérantes dans les ganglions périphériques. Ce qui est contraire au rat où les pDC CD4<sup>low</sup> sont prépondérantes dans la moelle osseuse et où ce sont les pDC CD4<sup>high</sup> qui sont prépondérantes dans les ganglions périphériques.

Les deux populations de pDC Ly49Q<sup>+/-</sup> de la souris sont en fait un état de différenciation différent. En effet, les pDC Ly49Q<sup>-</sup> ne sont présentes que dans la moelle osseuse et deviennent Ly49Q<sup>+</sup> en culture avec du Flt-3L (Kamogawa-Schifter et al., 2005). Nos populations de pDC ne peuvent donc pas être comparées à ces deux populations. En effet, les deux populations de pDC CD4<sup>high</sup> et CD4<sup>low</sup> sont présentes aussi bien dans la moelle osseuse qu'en périphérie.

La comparaison aux pDC humaines CD123<sup>low</sup> et CD123<sup>high</sup> repose sur le pouvoir qu'on les pDC CD123<sup>low</sup> à induire des LT Th17 et les pDC CD123<sup>high</sup> des LT producteurs d'IL10 (Schwab et al., 2010). Pour effectuer cette comparaison, il faudra analyser les cytokines produites lors de MLR entre les deux populations de pDC chez le rat et les différentes populations de LT naïfs (LT<sub>eff</sub>, LT<sub>reg</sub> et LT CD8<sup>+</sup>). Si une des deux populations de pDC du rat induit la production d'IL-10 par les LT elle pourra être rapprochée aux pDC CD123<sup>high</sup> humaines. Il faudra alors que l'autre population de pDC induise préférentiellement des LT Th17, producteurs d'IL-17, pour être rapprochées des pDC CD123<sup>low</sup> humaines. Ces deux populations ayant un ratio différent chez les patients atteints de sclérose en plaques ou non. Le ratio entre les deux populations de pDC pourra être analysé dans un modèle de sclérose en plaque chez le rat.

La comparaison avec les populations de pDC CD2<sup>±</sup> humaines (Matsui et al., 2009) reste compliqué sur la base de l'expression du CD2. En effet, les pDC CD4<sup>high</sup> et CD4<sup>low</sup> du rat n'expriment pas le CD2 à un niveau très différent. Il reste toutefois à analyser l'expression du lysozyme, responsable de l'hydrolyse de la paroi bactérienne, qui est exprimé spécifiquement par les pDC CD2<sup>high</sup> humaines. Cela permettra de déterminer si une même dichotomie est retrouvée chez le rat.

Les différentes populations de pDC décrites chez la souris et l'homme restent distinctes les unes des autres. En effet, il ne semble pas y avoir une dichotomie inter-espèce générale permettant d'identifier des populations de pDC. Les populations de pDC que nous venons d'identifier chez le rat sont donc probablement distinctes des autres populations de pDC déjà décrites chez l'homme et la souris.

### **Hypothèses fonctionnelles**

L'identification d'une nouvelle population de pDC s'accompagne d'une problématique inévitable. En effet, on en vient naturellement à se demander si ces deux populations ont des fonctions différentes et si oui quelles sont-elles. Nous n'avons pour l'instant mis en évidence aucune fonction différente et spécifique de l'une ou l'autre des deux populations. Toutefois, l'analyse des résultats de puces à ADNc nous offre de nombreuses hypothèses à explorer.

Nous avons tout d'abord montré que les pDC CD4<sup>low</sup> expriment fortement et de manière constitutive l'ARNm du Granzyme C. Elles expriment également près de 1000 fois plus l'ARNm du Granzyme B après maturation, l'ARNm des Granzymes K et M est, quant à lui, respectivement exprimé deux et trois fois plus au repos. Le test de cytotoxicité que nous avons réalisé, mesurant le relargage de Chrome<sup>51</sup> dû à la lyse des cellules cibles qui sont préalablement incubées avec le Chrome<sup>51</sup>, n'a montré aucun pouvoir cytotoxique particulier des deux populations de pDC. Il faudrait tester différentes lignées de cellules cibles, ayant des susceptibilités différentes. Le fait qu'elles expriment à la fois les Granzymes B et C laisse suggérer un potentiel cytotoxique important. En effet, le granzyme B est, avec le granzyme A, le granzyme le plus décrit et son pouvoir cytotoxique puissant est bien connu (Heusel et al., 1994). Pour que ces granzymes soient actifs, il faut toutefois qu'ils pénètrent la cellule cible par des pores formés par la perforine. Les pDC CD4<sup>high</sup> n'ont jamais montré d'expression de perforine, en ARNm et en protéine. Toutefois, les résultats de puces

à ADNC montrent une expression 6 fois supérieure de l'ARNm de la perforine par les pDC CD4<sup>low</sup> matures comparées aux fraîches. La validation de ces résultats est nécessaire mais si les pDC CD4<sup>low</sup> expriment effectivement, même en faible quantité, la perforine, cela pourrait supposer une activité cytotoxique très probable qu'il ne manquerait plus qu'à mettre en évidence avec les cellules cibles adéquates. Mais la perforine n'est pas l'unique voie de passage des granzymes vers le cytosol de la cellule. En effet, il a été montré que les granzymes pouvaient se fixer aux récepteurs de surface chargés négativement, principalement aux sulfates d'héparane (Kurschus et al., 2005). Le gène CD44 est composé de 20 exons dont 10 constitutifs et 10 autres présents par épissage alternatif. Une des formes du CD44, appelée CD44v3, car elle comporte l'exon 3, présente un domaine sulfate d'héparane et est décrite comme exprimée par les cellules endothéliales (Forster-Horváth et al., 2004; Ponta et al., 2003). L'expression de cet isoforme CD44v3 a été retrouvée dans différentes cellules cancéreuses (cancer du sein, colorectale, ...) (Kopp et al., 2009; Ryś et al., 2003; Wang et al., 2007; Forster-Horváth et al., 2004) pouvant suggérer une activité cytotoxique des pDC CD4<sup>low</sup> envers certaines cellules tumorales chez le rat. De plus, l'expression du CD44v3 est augmentée sur les LT de patients atteints de lupus systémique érythémateux (SLE) (Cohen et al., 2008; Seiter et al., 1998). Si c'est également le cas dans un modèle de SLE chez le rat, on peut imaginer que les pDC CD4<sup>low</sup> peuvent jouer un rôle dans la lyse des LT autoréactifs, prévenant ainsi la progression de la maladie autoimmune.

L'expression de l'ARNm de la chaîne gamma du CD3 par les pDC fraîches est surprenante. Cette expression chutant critiqueusement après maturation et n'étant pas retrouvé chez la souris, on peut se demander s'il ne s'agit pas d'un faux positif ou d'une mauvaise annotation des amorces fixées sur la puce. En effet, l'expression d'uniquement la chaîne gamma du CD3 n'aurait fonctionnellement aucune relevance.

L'expression de l'ARNm de la chaîne beta du CD8 apparait spécifique des pDC CD4<sup>high</sup> fraîches chez le rat et des pDC CD4<sup>+</sup> après une courte maturation chez la souris. Cette différence entre le rat et la souris est retrouvée avec le gène VLDLR et EPCR qui sont exprimés par les pDC CD4<sup>high</sup> fraîches chez le rat et par les pDC CD4<sup>+</sup> après 6h de maturation chez la souris. Ceci peut s'expliquer par un état de repos des pDC différent entre les deux espèces ou par une maturation basale des pDC de rat. Il peut également s'agir d'une maturation due à la méthode de purification des pDC de rat qui y sont peut être plus sensibles. Ou bien encore, un des Ac que l'on utilise pour la purification des pDC de rat peut entraîner une légère maturation. En effet, ceci a déjà été décrit chez la souris avec l'Ac

mPDCA1. Concernant cette expression de la chaîne beta du CD8, les pDC de rat n'expriment pas la chaîne alpha du CD8. L'expression de la molécule CD8 à la surface des cellules est principalement sous la forme d'un hétérodimère des chaînes alpha et beta. L'existence d'homodimères de chaîne bêta n'a été décrite que chez l'homme (Devine et al., 2000) mais ils ne peuvent pas se lier aux molécules du CMH I. La fonction de ses dimères reste encore floue. Chez la souris, les pDC expriment légèrement la protéine CD8 à leur surface, l'expression de la chaîne beta n'est donc pas surprenante. Chez le rat en revanche, les pDC n'expriment pas la protéine CD8. Le phénotype des deux populations de pDC fraîches a par ailleurs révélé qu'elles n'exprimaient ni la chaîne alpha ni la chaîne beta du CD8 à leur surface. L'expression de ce gène n'a donc probablement aucune signification fonctionnelle.

Comme décrit chez la souris, les pDC immatures expriment CD209a, aussi nommé SIGNR5 ou CIRE. L'expression chez les pDC CD4<sup>low</sup> reste remarquablement importante comparée aux pDC CD4<sup>high</sup>. Chez la souris, CD209a se lie aux résidus mannose mais ne semble se lier à aucun pathogène reconnu par son homologue humain (hDC-SIGN) et ne joue pas de rôle dans l'interaction DC-T (Caminschi et al., 2006). Son homologue humain supposé, hDC-SIGN, se lie à des virus comme le VIH et le cytomégalovirus, à des parasites comme *Leishmania mexicana*, à des bactéries comme *Mycobacterium* et reconnaît également des glycoprotéines du virus Ebola (van Kooyk et Geijtenbeek, 2003). Il reste à déterminer si, contrairement à son homologue murin, CD209a, chez le rat, reconnaît ces différents pathogènes. Etant donné la très forte expression de l'ARNm CD209a par les pDC CD4<sup>low</sup> fraîches, cela leur attribuerait, comme précédemment décrit dans la première partie de cette discussion avec leur phénotype dans la moelle osseuse, un rôle antiviral et antimicrobien.

Le récepteur de la protéine C activée (EPCR) se lie comme son nom l'indique à la protéine C activée (aPC). aPC est utilisé comme thérapie pour réduire la mortalité due au choc septique (Ruf, 2010). L'ARNm EPCR est fortement exprimé chez le rat par les pDC fraîches uniquement. Ces résultats laissent supposer un possible rôle des pDC de rat comme cible potentiel pour la prévention de la mortalité induite par un choc septique. Il reste néanmoins à confirmer la présence de la protéine à la surface des deux populations de pDC. Ensuite, comme cela a été récemment décrit chez la souris avec les DC CD8+ (Kerschen et al., 2010), des expériences de transfert adoptif de pDC exprimant EPCR dans des animaux portant une déficience du gène EPCR pourraient être réalisées afin de voir si

l'effet thérapeutique d'aPC est restauré. Toutefois, les résultats obtenus chez la souris diffèrent de ceux précédemment publiés. En effet, il a été décrit que les DC CD8<sup>+</sup> de souris sont les seules DC de souris exprimant EPCR (Kerschen et al., 2010). Or nos résultats obtenus chez la souris montrent une très forte expression de l'ARNm EPCR par les pDC CD4<sup>+</sup> au début de leur maturation. Cette expression est également retrouvée très importante dans les DC CD8<sup>-</sup> matures. Ce qui ne va pas dans le sens des résultats obtenus dans cette publication. Nos résultats de PCR restent à être confirmés par cytométrie pour vérifier l'expression de la protéine. Cette différence pourrait peut être s'expliquer par les souches de souris utilisées. En effet, dans la publication ils utilisent des souris C57Bl/6 et nous des souris de souche CBA.

L'expression importante de l'ARNm Pygm dans les pDC comparées aux cDC s'avère intéressante. En effet, cette enzyme est normalement exprimée seulement dans les cellules musculaires en grande quantité. Elle assure l'entrée du glycogène stocké dans la glycolyse par génération de glucose-1-phosphate à partir du glycogène, permettant ainsi la génération rapide d'énergie dans la cellule, ce dont les cellules musculaires ont énormément besoin. Pour les pDC cela peut se comprendre aussi. En effet, leur maturation débute par une énorme production d'IFN de type 1 qui nécessite énormément d'énergie. L'expression importante de cette enzyme pourrait en être une source. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait pouvoir mesurer la quantité de glycogène stocké dans les pDC. Pour cela, un simple dosage colorimétrique avec de l'eau iodée peut être suffisant après extraction du glycogène. Une technique plus précise serait l'hydrolyse totale du glycogène extrait puis le dosage du glucose, technique plus lourde mais plus précise. Toutefois, ces résultats ne sont pas confirmés chez la souris, il faut donc rester prudent tant que la présence protéique de cette enzyme n'est pas confirmée.

La Reeline, une protéine de la matrice extracellulaire, contrôle la migration des neurones (Cooper, 2008) et l'établissement des couches cellulaires du cortex cérébral (Caviness, 1976). La Reeline assure aussi la stabilisation du cytosquelette des neurones (Chai et al., 2009) et la formation de leurs dendrites (Nichols et Olson, 2010; Hoe et al., 2009). Ses récepteurs sont VLDLR, ApoER2 et des récepteurs neuronaux associés à la cadhérine. Chez le rat, les pDC CD4<sup>high</sup> surexpriment l'ARNm de la Reeline après 24h de maturation. L'ARNm VLDLR est quant à lui surexprimé par les deux populations de pDC après 24h de maturation. La première idée qui nous vient à l'esprit est que la Reeline exprimée par les pDC pourrait jouer un rôle sur la formation de leurs dendrites. Mais n'étant exprimé qu'après maturation,

les pDC ayant déjà leur morphologie dendritique, il est peu probable que la Reeline intervienne dans l'établissement initial des dendrites. En revanche cela pourrait jouer un rôle dans un développement secondaire des dendrites de manière autocrine. D'autres protéines habituellement décrites dans le système nerveux et assurant la ramification des dendrites neuronales ont également été retrouvées dans les résultats de puces à ADNc. En effet, la protéine activatrice des GTPases Slit-Robo 2 (srGAP2) (Guerrier et al., 2009) apparaît comme surexprimée par les deux populations de pDC fraîches. Cette observation reste toutefois à être validée par PCR quantitative. La protéine Robo1 (Roundabout axon guidance homologue 1) (Whitford et al., 2002) apparaît également fortement surexprimée après 24h de maturation uniquement par les pDC CD4<sup>high</sup>. L'identification de toutes ces molécules impliquées dans la formation et la ramification des dendrites des neurones et exprimées par les pDC ne peut pas être qu'une coïncidence ou une erreur d'annotation. Cette hypothèse serait donc intéressante à approfondir en microscopie confocale ou en time lapse. Nous pourrions alors analyser la formation des dendrites des pDC lors de traitement en présence d'inhibiteur de ces différentes protéines ou au contraire en présence de quantité importante de ces protéines.

La Reeline intervenant dans la migration des neurones, on peut imaginer qu'elle ait un impact sur la mobilité des pDC. Les pDC matures pourraient ainsi attirer par chimiotactisme d'autres pDC sur leur site de maturation, potentialisant ainsi leur réponse. La Reeline permet également le contrôle des fonctions synaptiques en inhibant l'internalisation de récepteurs glutamatergiques, permettant ainsi la transmission excitatrice du signal. Les pDC CD4<sup>high</sup> activées pourraient ainsi jouer un rôle d'agoniste de la transmission du signal synaptique au niveau du système nerveux périphérique. Ceci pourrait être analysé in-vitro. En effet, on pourrait vérifier que la Reeline produite par les pDC induit la phosphorylation du récepteur glutamatergique par western-blot, phosphorylation qui protège de l'internalisation du récepteur.

Le gène RoBo-1 a été décrit chez le rat comme codant une nouvelle protéine appartenant à la famille des récepteurs de l'activateur du plasminogène type urokinase/CD59/Ly6/toxine de serpent (Noel et al., 1998), famille à laquelle appartient Ly6-C qui est un marqueur des pDC de souris. Thy-1 (CD90), marqueur observé exprimé fortement sur les pDC CD4<sup>low</sup> et plus variablement sur les pDC CD4<sup>high</sup> fait également partie de cette famille. RoBo-1 n'a été décrit qu'au niveau génomique. En effet, aucune caractérisation, de la protéine n'a été encore publiée 12 ans après l'identification de ce gène. La très forte

expression de ce gène par les deux populations de pDC fraîches apparaît intéressante pour en faire un marqueur potentiel de ces cellules. Toutefois, l'absence d'identification de la protéine et de publication postérieure à la découverte du gène rend son étude complexe. Son potentiel équivalent chez la souris, GM12253, est également décrit uniquement au niveau génomique sans aucune publication associée. Son étude, en dehors du niveau génomique, va donc être également complexe. Des expériences d'hybridation in-situ pourront toutefois être réalisées pour déterminer la localisation intracellulaire ou tissulaire, sur coupe de rate ou cytopins de cellules, de l'expression de RoBo-1.

### **Expression de TRANCE par les pDC**

La protéine TRANCE, après confirmation des résultats obtenus par puces à ADNc, apparaît exprimée constitutivement par les pDC CD4<sup>high</sup> et après maturation pour les pDC CD4<sup>low</sup>. L'expression dans les pDC CD4<sup>low</sup> apparaît toutefois plus importante juste après maturation. La présence prépondérante des pDC CD4<sup>low</sup> dans la moelle osseuse pourrait entraîner, lors d'une infection virale, un dérèglement de la balance entre formation et résorption osseuse pour favoriser la formation d'ostéoclastes qui détruiront l'os via leur forte expression et production de TRANCE. En effet, TRANCE est largement connu pour son rôle indispensable lors de l'ostéoclastogénèse (Fuller et al., 1998). TRANCE est produit sous forme membranaire, mais aussi sous forme soluble. La forme soluble provient soit d'un épissage alternatif conduisant à une protéine TRANCE dépourvue de domaine intracytoplasmique et membranaire, soit du clivage enzymatique de la forme membranaire par TACE (ADAM17), une métalloprotéase (Lum et al., 1999a). Dans les résultats de puces à ADNc, toutes les DC semblent exprimer TACE, on peut donc imaginer que l'expression membranaire de TRANCE par les pDC soit clivée sous forme soluble par la métalloprotéase TACE produite par les DC. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait mesurer la quantité de TRANCE soluble relarguée par les deux populations de pDC en présence d'un inhibiteur spécifique de la métalloprotéase TACE, GW280264X ou TAPI-2. Nous devrions alors observer une nette diminution de la quantité de TRANCE dans le surnageant de culture. L'observation en parallèle par cytométrie de l'expression membranaire de TRANCE devrait, quant à elle, être plus importante dû à l'absence de clivage. TRANCE ayant été décrit comme un facteur de survie des DC matures (Josien et al., 2000), on peut imaginer que l'expression de TRANCE par les pDC joue un rôle dans l'amélioration de la survie des DC matures, qui expriment

RANK. De manière intéressante, des études récentes ont montrés que les pDC pouvaient potentialiser les fonctions des cDC via l'interaction CD40/CD40L, CD40L étant exprimé par les pDC (Kuwajima et al., 2006; Yoneyama et al., 2005). CD40L et TRANCE partageant des fonctions, des voies de signalisation et étant tous les membres de la super-famille du TNF (Ouaaz et al., 2002; Ma et Clark, 2009; Wong et al., 1997a), l'expression de TRANCE par les pDC pourrait participer à la coopération pDC-cDC afin d'améliorer les fonctions immunitaires des cDC.

Des modèles de génération d'ostéoclastes existants in-vitro, nous avons voulu voir si la production et l'expression membranaire de TRANCE par les deux populations de pDC pouvait induire la formation d'ostéoclastes. Mais quel que soit le modèle et l'état d'activation des cellules utilisées, nous n'avons pas réussi à induire d'ostéoclastogénèse avec les pDC, ni avec des LT activés communément utilisés dans certains modèles d'ostéoclastogénèse médiée par des cellules (Kawai et al., 2006). Certaines cytokines sont connues pour inhiber l'ostéoclastogénèse (IL-4; -10, -12, -13, -18, GM-CSF, IFN $\alpha$  et IFN $\gamma$ ). Les pDC produisent de nombreuses cytokines au cours de leur maturation (Hubert et al., 2004), parmi elles l'IL-12, GM-CSF et surtout des quantités énormes d'IFN $\alpha$ . Ces cytokines inhibitrices peuvent expliquer l'absence de formation d'ostéoclastes. Nous avons donc utilisé des pDC CD4<sup>high</sup> fraîchement triées et non stimulées, ne produisant pas ces cytokines inhibitrices, notamment les grandes quantités d'IFN $\alpha$ . Mais cela n'a pas été suffisant pour induire la formation d'ostéoclastes. C'est pourquoi nous avons fixé les cellules par la suite au PFA, pour qu'elles ne produisent vraiment aucune cytokine et que seul le TRANCE membranaire n'intervienne. Mais nous avons obtenu le même résultat. Ceci est très certainement dû à la production de TRANCE soluble qui est probablement trop faible pour induire une ostéoclastogénèse efficace. En effet, la quantité minimale de TRANCE soluble nécessaire que nous avons observé pour obtenir des ostéoclastes est de 50ng/mL. Cette quantité est près de 350 fois supérieure à la production de TRANCE soluble par les pDC CD4<sup>high</sup> après maturation et 130 fois supérieure à celle des pDC CD4<sup>low</sup>. Même si la forme membranaire peut également jouer un rôle, l'expression et la production de TRANCE par les pDC est sans doute trop faible pour induire une ostéoclastogénèse et est aisément contrecarrée par les cytokines inhibitrices produites. La production très importante d'IL-6 par les pDC, facteur connu pour son rôle pro-ostéoclastogénique (Gorny et al., 2004), aurait pourtant pu jouer un rôle agoniste. Toutefois, ce même facteur a été plus récemment décrit comme inhibant

l'ostéoclastogénèse, dérivant les précurseurs ostéoclastiques vers la lignée macrophagique (Duplomb et al., 2008). Ceci est un argument supplémentaire pouvant expliquer l'absence de formation d'ostéoclastes avec les pDC. Si les pDC ne sont pas capables d'induire à elles seules la formation d'ostéoclastes, elles peuvent agir en synergie avec d'autres cellules comme les cellules stromales ou les ostéoblastes. En effet ces cellules, en réponse à l'IL-6, induisent une ostéoclastogénèse beaucoup plus importante via une production de TRANCE augmentée (Kramer et Gaffen, 2007).

Pour savoir si la quantité de TRANCE soluble produite et exprimée par les pDC pourrait être suffisante à une ostéoclastogénèse, il faudrait quantifier la production et l'expression de TRANCE par les ostéoblastes et les cellules stromales chez le rat, cellules induisant la formation d'ostéoclastes in-vivo (Udagawa et al., 1999; Takahashi et al., 1988).

# Conclusion

Cette étude a donc permis la caractérisation de deux sous-populations de pDC, distinguées suivant leur expression du marqueur CD4, chez le rat. Ce sont les premières sous-populations de pDC dans cette espèce. Les pDC CD4<sup>low</sup>, au vue de leur localisation, leur production de cytokines et leur expression génique, pourraient jouer un rôle de première ligne de défense antivirale dans la moelle osseuse. Le rôle fonctionnel de l'expression de TRANCE par les pDC, restreinte au rat, reste indéterminé. Son implication dans la régulation du métabolisme osseux pour les pDC CD4<sup>low</sup> reste probable. Concernant l'expression de TRANCE par les pDC CD4<sup>high</sup>, son intervention dans la survie des DC reste à être déterminée. Beaucoup de travail est encore à réaliser au niveau de l'analyse des puces à ADN et l'étude des gènes en ressortant. Cette étude permettra de définir plus précisément les fonctions spécifiques de chacune des deux populations de pDC chez le rat.

---

# Bibliographie

---

- Aderem, A., et Underhill, D. M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol* 17, 593-623.
- Akdis, C. A., Blesken, T., Akdis, M., Wüthrich, B., et Blaser, K. (1998). Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J. Clin. Invest* 102, 98-106.
- Albanesi, C., Scarponi, C., Pallotta, S., Daniele, R., Bosisio, D., Madonna, S., Fortugno, P., Gonzalvo-Feo, S., Franssen, J., Parmentier, M., et al. (2009). Chemerin expression marks early psoriatic skin lesions and correlates with plasmacytoid dendritic cell recruitment. *J. Exp. Med* 206, 249-258.
- Albert, M. L., Pearce, S. F., Francisco, L. M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R. L., et Bhardwaj, N. (1998a). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med* 188, 1359-1368.
- Albert, M. L., Pearce, S. F., Francisco, L. M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R. L., et Bhardwaj, N. (1998b). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med* 188, 1359-1368.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., et Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732-738.
- Allman, D., Dalod, M., Asselin-Paturel, C., Delale, T., Robbins, S. H., Trinchieri, G., Biron, C. A., Kastner, P., et Chan, S. (2006). Ikaros is required for plasmacytoid dendritic cell differentiation. *Blood* 108, 4025-4034.
- Alnaeeli, M., Penninger, J. M., et Teng, Y. A. (2006). Immune interactions with CD4+ T cells promote the development of functional osteoclasts from murine CD11c+ dendritic cells. *J. Immunol* 177, 3314-3326.
- Amano, S., Sekine, K., Bonewald, L. F., et Ohmori, Y. (2009). A novel osteoclast precursor cell line, 4B12, recapitulates the features of primary osteoclast differentiation and function: enhanced transfection efficiency before and after differentiation. *J. Cell. Physiol* 221, 40-53.
- Anderson, D. M., Maraskovsky, E., Billingsley, W. L., Dougall, W. C., Tometsko, M. E., Roux, E. R., Teepe, M. C., DuBose, R. F., Cosman, D., et Galibert, L. (1997). A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390, 175-179.
- Anderson, M. S., Venanzi, E. S., Chen, Z., Berzins, S. P., Benoist, C., et Mathis, D. (2005). The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity* 23, 227-239.
- Arron, J. R., et Choi, Y. (2000). Bone versus immune system. *Nature* 408, 535-536.
- 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. (2001a). Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat. Immunol* 2, 1144-1150.
- 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. (2001b). Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat. Immunol* 2, 1144-1150.
- Asselin-Paturel, C., et Trinchieri, G. (2005). Production of type I interferons: plasmacytoid dendritic cells and beyond. *J Exp Med* 202, 461-5.
- Asselin-Paturel, C., Brizard, G., Pin, J., Brière, F., et Trinchieri, G. (2003). Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody. *J. Immunol* 171, 6466-6477.
- Atzeni, F., Schena, M., Ongari, A. M., Carrabba, M., Bonara, P., Minonzio, F., et Capsoni, F. (2002). Induction of CD69 activation molecule on human neutrophils by GM-CSF, IFN-gamma, and IFN-alpha. *Cell. Immunol* 220, 20-29.
- Avnet, S., Cenni, E., Perut, F., Granchi, D., Brandi, M. L., Giunti, A., et Baldini, N. (2007). Interferon-alpha inhibits in vitro osteoclast differentiation and renal cell carcinoma-induced angiogenesis. *Int. J. Oncol* 30, 469-476.
- Bachmann, M. F., Wong, B. R., Josien, R., Steinman, R. M., Oxenius, A., et Choi, Y. (1999). TRANCE, a tumor necrosis factor family member critical for CD40 ligand-independent T helper cell activation. *J Exp Med* 189, 1025-31.
- Bajtay, Z., Csomor, E., Sándor, N., et Erdei, A. (2006). Expression and role of Fc- and complement-receptors on human dendritic cells. *Immunol. Lett* 104, 46-52.
- 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, 245-52.
- Bandyopadhyay, S., Perussia, B., Trinchieri, G., Miller, D. S., et Starr, S. E. (1986). Requirement for HLA-DR+ accessory cells in natural killing of cytomegalovirus-infected fibroblasts. *J. Exp. Med* 164, 180-195.
- Barois, N., de Saint-Vis, B., Lebecque, S., Geuze, H. J., et Kleijmeer, M. J. (2002). MHC class II compartments in human dendritic cells undergo profound structural changes upon activation. *Traffic* 3, 894-905.
- Barrat, F. J., Meeker, T., Gregorio, J., Chan, J. H., Uematsu, S., Akira, S., Chang, B., Duramad, O., et Coffman, R. L. (2005). Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med* 202, 1131-1139.

- Beier, K. C., Hutloff, A., Dittrich, A. M., Heuck, C., Rauch, A., Büchner, K., Ludewig, B., Ochs, H. D., Mages, H. W., et Kroczeck, R. A. (2000). Induction, binding specificity and function of human ICOS. *Eur. J. Immunol* 30, 3707-3717.
- Benitez-Ribas, D., Adema, G. J., Winkels, G., Klasen, I. S., Punt, C. J. A., Figdor, C. G., et de Vries, I. J. M. (2006). Plasmacytoid dendritic cells of melanoma patients present exogenous proteins to CD4+ T cells after Fc gamma RII-mediated uptake. *J. Exp. Med* 203, 1629-1635.
- Bevan, M. J. (1976). Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming. *J. Immunol* 117, 2233-2238.
- Bezouska, K., Yuen, C. T., O'Brien, J., Childs, R. A., Chai, W., Lawson, A. M., Drbal, K., Fiserová, A., Pospíšil, M., et Feizi, T. (1994). Oligosaccharide ligands for NKR-P1 protein activate NK cells and cytotoxicity. *Nature* 372, 150-157.
- Bieber, T. (1992). Fc epsilon RII/CD23 on epidermal Langerhans' cells. *Res. Immunol* 143, 445-447.
- Bilsborough, J., George, T. C., Norment, A., et Viney, J. L. (2003). Mucosal CD8alpha+ DC, with a plasmacytoid phenotype, induce differentiation and support function of T cells with regulatory properties. *Immunology* 108, 481-492.
- 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.
- Blair, J. M., Zhou, H., Seibel, M. J., et Dunstan, C. R. (2006). Mechanisms of disease: roles of OPG, RANKL and RANK in the pathophysiology of skeletal metastasis. *Nat Clin Pract Oncol* 3, 41-49.
- Blanco, P., Palucka, A. K., Gill, M., Pascual, V., et Banchereau, J. (2001). Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. *Science* 294, 1540-1543.
- Blasius, A. L., Cella, M., Maldonado, J., Takai, T., et Colonna, M. (2006). Siglec-H is an IPC-specific receptor that modulates type I IFN secretion through DAP12. *Blood* 107, 2474-2476.
- Boasso, A., Herbeuval, J., Hardy, A. W., Anderson, S. A., Dolan, M. J., Fuchs, D., et Shearer, G. M. (2007). HIV inhibits CD4+ T-cell proliferation by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase in plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 109, 3351-3359.
- 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.
- Boogaard, I., van Oosten, M., van Rijt, L. S., Muskens, F., Kimman, T. G., Lambrecht, B. N., et Buisman, A. (2007). Respiratory syncytial virus differentially activates murine myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Immunology* 122, 65-72.
- Bouchet, D., Tesson, L., Ménoret, S.,

- Charreau, B., Mathieu, P., Yagita, H., Duisit, G., et Anegon, I. (2002). Differential sensitivity of endothelial cells of various species to apoptosis induced by gene transfer of Fas ligand: role of FLIP levels. *Mol. Med* 8, 612-623.
- Boyle, W. J., Simonet, W. S., et Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423, 337-42.
- Bratke, K., Nielsen, J., Manig, F., Klein, C., Kuepper, M., Geyer, S., Julius, P., Lommatzsch, M., et Virchow, J. C. (2010). Functional expression of granzyme B in human plasmacytoid dendritic cells: a role in allergic inflammation. *Clin Exp Allergy*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/20412137> [Accédé Juin 10, 2010].
- Brigl, M., et Brenner, M. B. (2004). CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu. Rev. Immunol* 22, 817-890.
- Brinkmann, V., Geiger, T., Alkan, S., et Heusser, C. H. (1993). Interferon alpha increases the frequency of interferon gamma-producing human CD4+ T cells. *J. Exp. Med* 178, 1655-1663.
- Bucay, N., Sarosi, I., Dunstan, C. R., Morony, S., Tarpley, J., Capparelli, C., Scully, S., Tan, H. L., Xu, W., Lacey, D. L., et al. (1998). osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 12, 1260-1268.
- Cambi, A., Beeren, I., Joosten, B., Fransen, J. A., et Figdor, C. G. (2009). The C-type lectin DC-SIGN internalizes soluble antigens and HIV-1 virions via a clathrin-dependent mechanism. *European Journal of Immunology* 39, 1923-1928.
- Caminschi, I., Corbett, A. J., Zahra, C., Lahoud, M., Lucas, K. M., Sofi, M., Vremec, D., Gramberg, T., Pöhlmann, S., Curtis, J., et al. (2006). Functional comparison of mouse CIRE/mouse DC-SIGN and human DC-SIGN. *Int. Immunol* 18, 741-753.
- Cao, W., Bover, L., Cho, M., Wen, X., Hanabuchi, S., Bao, M., Rosen, D. B., Wang, Y., Shaw, J. L., Du, Q., et al. (2009). Regulation of TLR7/9 responses in plasmacytoid dendritic cells by BST2 and ILT7 receptor interaction. *J. Exp. Med* 206, 1603-1614.
- Cao, W., Rosen, D. B., Ito, T., Bover, L., Bao, M., Watanabe, G., Yao, Z., Zhang, L., Lanier, L. L., et Liu, Y. (2006). Plasmacytoid dendritic cell-specific receptor ILT7-Fc epsilonRI gamma inhibits Toll-like receptor-induced interferon production. *J. Exp. Med* 203, 1399-1405.
- Caulfield, J. J., Hawrylowicz, C. M., Kemeny, D. M., et Lee, T. H. (1997). GM-CSF increases the ability of cultured macrophages to support autologous CD4+ T-cell proliferation in response to Dermatophagoides pteronyssinus and PPD antigen. *Immunology* 92, 123-130.
- Cavanagh, L. L., Boyce, A., Smith, L., Padmanabha, J., Filgueira, L., Pietschmann, P., et Thomas, R. (2005). Rheumatoid arthritis synovium contains plasmacytoid dendritic cells. *Arthritis Res. Ther* 7, R230-240.
- Cavanagh, L. L., et Von Andrian, U. H. (2002). Travellers in many guises:

- the origins and destinations of dendritic cells. *Immunol. Cell Biol* 80, 448-462.
- Caviness, V. S. (1976). Patterns of cell and fiber distribution in the neocortex of the reeler mutant mouse. *J. Comp. Neurol* 170, 435-447.
- Cella, M., Facchetti, F., Lanzavecchia, A., et Colonna, M. (2000). Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat. Immunol* 1, 305-310.
- Chai, X., Förster, E., Zhao, S., Bock, H. H., et Frotscher, M. (2009). Reelin stabilizes the actin cytoskeleton of neuronal processes by inducing n-cofilin phosphorylation at serine3. *J. Neurosci* 29, 288-299.
- Chaperot, L., Blum, A., Manches, O., Lui, G., Angel, J., Molens, J., et Plumas, J. (2006a). Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol* 176, 248-255.
- Chaperot, L., Blum, A., Manches, O., Lui, G., Angel, J., Molens, J., et Plumas, J. (2006b). Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol* 176, 248-255.
- Chauvin, C., Philippeau, J., Hémond, C., Hubert, F., Wittrant, Y., Lamoureux, F., Trinité, B., Heymann, D., Rédini, F., et Josien, R. (2008). Killer dendritic cells link innate and adaptive immunity against established osteosarcoma in rats. *Cancer Res* 68, 9433-9440.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., et Wahl, S. M. (2003). Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naive T cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med* 198, 1875-1886.
- Cheng, M. H., Shum, A. K., et Anderson, M. S. (2007). What's new in the Aire? *Trends Immunol* 28, 321-327.
- 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, Y., Woo, K. M., Ko, S. H., Lee, Y. J., Park, S. J., Kim, H. M., et Kwon, B. S. (2001). Osteoclastogenesis is enhanced by activated B cells but suppressed by activated CD8(+) T cells. *Eur. J. Immunol* 31, 2179-2188.
- Choo, J. K., Seebach, J. D., Nickleit, V., Shimizu, A., Lei, H., Sachs, D. H., et Madsen, J. C. (1997). Species differences in the expression of major histocompatibility complex class II antigens on coronary artery endothelium: implications for cell-mediated xenoreactivity. *Transplantation* 64, 1315-1322.
- 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.
- Cisse, B., Caton, M. L., Lehner, M., Maeda, T., Scheu, S., Locksley, R.,

- Holmberg, D., Zweier, C., den Hollander, N. S., Kant, S. G., et al. (2008a). Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell* *135*, 37-48.
- Cisse, B., Caton, M. L., Lehner, M., Maeda, T., Scheu, S., Locksley, R., Holmberg, D., Zweier, C., den Hollander, N. S., Kant, S. G., et al. (2008b). Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell* *135*, 37-48.
- 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.
- Coffman, R. L. (1982). Surface antigen expression and immunoglobulin gene rearrangement during mouse pre-B cell development. *Immunol. Rev* *69*, 5-23.
- Cohen, R. A., Bayliss, G., Crispin, J. C., Kane-Wanger, G. F., Van Beek, C. A., Kyttaris, V. C., Avalos, I., Yu, C. Y., Tsokos, G. C., et Stillman, I. E. (2008). T cells and in situ cryoglobulin deposition in the pathogenesis of lupus nephritis. *Clin. Immunol* *128*, 1-7.
- Colina, R., Costa-Mattioli, M., Dowling, R. J. O., Jaramillo, M., Tai, L., Breitbach, C. J., Martineau, Y., Larsson, O., Rong, L., Svitkin, Y. V., et al. (2008). Translational control of the innate immune response through IRF-7. *Nature* *452*, 323-328.
- Colisson, R., Barblu, L., Gras, C., Raynaud, F., Hadj-Slimane, R., Pique, C., Hermine, O., Lepelletier, Y., et Herbeuval, J. (2010). Free HTLV-1 induces TLR7-dependent innate immune response and TRAIL relocalization in killer plasmacytoid dendritic cells. *Blood* *115*, 2177-2185.
- Collin-Osdoby, P. (2004). Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. *Circ. Res* *95*, 1046-1057.
- Commins, S. P., Borish, L., et Steinke, J. W. (2010). Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *J. Allergy Clin. Immunol* *125*, S53-72.
- Cooper, J. A. (2008). A mechanism for inside-out lamination in the neocortex. *Trends Neurosci* *31*, 113-119.
- Corcoran, L., Ferrero, I., Vremec, D., Lucas, K., Waithman, J., O'Keefe, M., Wu, L., Wilson, A., et Shortman, K. (2003). The lymphoid past of mouse plasmacytoid cells and thymic dendritic cells. *J. Immunol* *170*, 4926-4932.
- Croft, M. (2003). Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat. Rev. Immunol* *3*, 609-620.
- Cyster, J. G. (1999). Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs. *J. Exp. Med* *189*, 447-450.
- Dalgaard, J., Beckstrøm, K. J., Jahnsen, F. L., et Brinchmann, J. E. (2005). Differential capability for phagocytosis of apoptotic and necrotic leukemia cells by human

- peripheral blood dendritic cell subsets. *J. Leukoc. Biol* 77, 689-698.
- 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.
- D'Amico, G., Bianchi, G., Bernasconi, S., Bersani, L., Piemonti, L., Sozzani, S., Mantovani, A., et Allavena, P. (1998). Adhesion, transendothelial migration, and reverse transmigration of in vitro cultured dendritic cells. *Blood* 92, 207-214.
- Dang, P. M., Stensballe, A., Boussetta, T., Raad, H., Dewas, C., Kroviarski, Y., Hayem, G., Jensen, O. N., Gougerot-Pocidallo, M., et El-Benna, J. (2006). A specific p47phox -serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *J. Clin. Invest* 116, 2033-2043.
- Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R. A., Mitsdoerffer, M., Strom, T. B., Elyaman, W., Ho, I., et al. (2008). IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat. Immunol* 9, 1347-1355.
- Devine, L., Kieffer, L. J., Aitken, V., et Kavathas, P. B. (2000). Human CD8 beta, but not mouse CD8 beta, can be expressed in the absence of CD8 alpha as a beta beta homodimer. *J. Immunol* 164, 833-838.
- Di Pucchio, T., Chatterjee, B., Smed-Sörensen, A., Clayton, S., Palazzo, A., Montes, M., Xue, Y., Mellman, I., Banchereau, J., et Connolly, J. E. (2008). Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. *Nat. Immunol* 9, 551-557.
- Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., et Reis e Sousa, C. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303, 1529-1531.
- 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.
- Dillon, S. M., Robertson, K. B., Pan, S. C., Mawhinney, S., Meditz, A. L., Folkvord, J. M., Connick, E., McCarter, M. D., et Wilson, C. C. (2008). Plasmacytoid and myeloid dendritic cells with a partial activation phenotype accumulate in lymphoid tissue during asymptomatic chronic HIV-1 infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr* 48, 1-12.
- Dombrowicz, D., et Capron, M. (2001). Eosinophils, allergy and parasites. *Curr. Opin. Immunol* 13, 716-720.
- Donaghy, H., Bosnjak, L., Harman, A. N., Marsden, V., Tyring, S. K., Meng, T., et Cunningham, A. L. (2009). Role for plasmacytoid dendritic cells in the immune control of recurrent human herpes simplex virus infection. *J. Virol* 83, 1952-1961.

- Dougall, W. C., Glaccum, M., Charrier, K., Rohrbach, K., Brasel, K., De Smedt, T., Daro, E., Smith, J., Tometsko, M. E., Maliszewski, C. R., et al. (1999). RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* *13*, 2412-2424.
- Dubsky, P., Ueno, H., Piqueras, B., Connolly, J., Banchereau, J., et Palucka, A. K. (2005). Human dendritic cell subsets for vaccination. *J. Clin. Immunol* *25*, 551-572.
- Duplomb, L., Baud'huin, M., Charrier, C., Berreur, M., Trichet, V., Blanchard, F., et Heymann, D. (2008). Interleukin-6 inhibits receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-induced osteoclastogenesis by diverting cells into the macrophage lineage: key role of Serine727 phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3. *Endocrinology* *149*, 3688-3697.
- Dustin, M. L., Olszowy, M. W., Holdorf, A. D., Li, J., Bromley, S., Desai, N., Widder, P., Rosenberger, F., van der Merwe, P. A., Allen, P. M., et al. (1998). A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell* *94*, 667-677.
- Dzionic, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D. W., et Schmitz, J. (2000). BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J. Immunol* *165*, 6037-6046.
- Dzionic, A., Sohma, Y., Nagafune, J., Cella, M., Colonna, M., Facchetti, F., Günther, G., Johnston, I., Lanzavecchia, A., Nagasaka, T., et al. (2001a). BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J. Exp. Med* *194*, 1823-1834.
- Dzionic, A., Sohma, Y., Nagafune, J., Cella, M., Colonna, M., Facchetti, F., Günther, G., Johnston, I., Lanzavecchia, A., Nagasaka, T., et al. (2001b). BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J. Exp. Med* *194*, 1823-1834.
- Dzionic, A., Inagaki, Y., Okawa, K., Nagafune, J., Röck, J., Sohma, Y., Winkels, G., Zysk, M., Yamaguchi, Y., et Schmitz, J. (2002). Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Hum. Immunol* *63*, 1133-1148.
- East, L., et Isacke, C. M. (2002). The mannose receptor family. *Biochim. Biophys. Acta* *1572*, 364-386.
- Emery, J. G., McDonnell, P., Burke, M. B., Deen, K. C., Lyn, S., Silverman, C., Dul, E., Appelbaum, E. R., Eichman, C., DiPrinzio, R., et al. (1998). Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem* *273*, 14363-14367.
- 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.
- Esposito-Farese, M. E., Sautès, C., de la Salle, H., Latour, S., Bieber, T., de la Salle, C., Ohlmann, P., Fridman, W. H., Cazenave, J. P., et Teillaud, J. L. (1995). Membrane and soluble Fc gamma RII/III modulate the antigen-presenting capacity of murine dendritic epidermal Langerhans cells for IgG-complexed antigens. *J. Immunol* 155, 1725-1736.
- Facchetti, F., de Wolf-Peeters, C., Mason, D. Y., Pulford, K., van den Oord, J. J., et Desmet, V. J. (1988). Plasmacytoid T cells. Immunohistochemical evidence for their monocyte/macrophage origin. *Am. J. Pathol* 133, 15-21.
- Facchetti, F., de Wolf-Peeters, C., van den Oord, J. J., de Vos, R., et Desmet, V. J. (1989). Plasmacytoid monocytes (so-called plasmacytoid T-cells) in Kikuchi's lymphadenitis. An immunohistologic study. *Am. J. Clin. Pathol* 92, 42-50.
- Falb, D., Briner, T. J., Sunshine, G. H., Bourque, C. R., Luqman, M., Gefter, M. L., et Kamradt, T. (1996). Peripheral tolerance in T cell receptor-transgenic mice: evidence for T cell anergy. *Eur. J. Immunol* 26, 130-135.
- Fallarino, F., Asselin-Paturel, C., Vacca, C., Bianchi, R., Gizzi, S., Fioretti, M. C., Trinchieri, G., Grohmann, U., et Puccetti, P. (2004). Murine plasmacytoid dendritic cells initiate the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in response to CD200 receptor engagement. *J. Immunol* 173, 3748-3754.
- Fanger, N. A., Wardwell, K., Shen, L., Tedder, T. F., et Guyre, P. M. (1996). Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J. Immunol* 157, 541-548.
- Farkas, L., Beiske, K., Lund-Johansen, F., Brandtzaeg, P., et Jahnsen, F. L. (2001). Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon- alpha/beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *Am. J. Pathol* 159, 237-243.
- Fata, J. E., Kong, Y. Y., Li, J., Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Moorehead, R. A., Elliott, R., Scully, S., Voura, E. B., Lacey, D. L., et al. (2000a). The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* 103, 41-50.
- Fata, J. E., Kong, Y. Y., Li, J., Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Moorehead, R. A., Elliott, R., Scully, S., Voura, E. B., Lacey, D. L., et al. (2000b). The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* 103, 41-50.
- Ferbas, J. J., Toso, J. F., Logar, A. J., Navratil, J. S., et Rinaldo, C. R. (1994). CD4+ blood dendritic cells are potent producers of IFN-alpha in response to in vitro HIV-1 infection. *J. Immunol* 152, 4649-4662.
- Fields, K. L., Brockes, J. P., Mirsky, R., et Wendon, L. M. (1978). Cell surface markers for distinguishing different types of rat dorsal root ganglion cells in culture. *Cell* 14, 43-51.

- 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.
- Fitzgerald-Bocarsly, P., Feldman, M., Mendelsohn, M., Curl, S., et Lopez, C. (1988). Human mononuclear cells which produce interferon-alpha during NK(HSV-FS) assays are HLA-DR positive cells distinct from cytolytic natural killer effectors. *J. Leukoc. Biol* 43, 323-334.
- Fitzgerald-Bocarsly, P., et Jacobs, E. S. (2010). Plasmacytoid dendritic cells in HIV infection: striking a delicate balance. *J. Leukoc. Biol* 87, 609-620.
- Fleming, A. (1922). On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* 93, 306-317.
- 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.
- Folkl, A., et Bienzle, D. (2010). Structure and function of programmed death (PD) molecules. *Vet. Immunol. Immunopathol* 134, 33-38.
- Fonteneau, J., Gilliet, M., Larsson, M., Dasilva, I., Münz, C., Liu, Y., et Bhardwaj, N. (2003). Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood* 101, 3520-3526.
- Fonteneau, J., Larsson, M., Beignon, A., McKenna, K., Dasilva, I., Amara, A., Liu, Y., Lifson, J. D., Littman, D. R., et Bhardwaj, N. (2004). Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells. *J. Virol* 78, 5223-5232.
- Förster, R., Davalos-Miszlitz, A. C., et Rot, A. (2008). CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat. Rev. Immunol* 8, 362-371.
- Forster-Horváth, C., Mészáros, L., Rásó, E., Döme, B., Ladányi, A., Morini, M., Albini, A., et Tímár, J. (2004). Expression of CD44v3 protein in human endothelial cells in vitro and in tumoral microvessels in vivo. *Microvasc. Res* 68, 110-118.
- Francis, J. N., Till, S. J., et Durham, S. R. (2003). Induction of IL-10+CD4+CD25+ T cells by grass pollen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol* 111, 1255-1261.
- Friedl, P., den Boer, A. T., et Gunzer, M. (2005). Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol* 5, 532-545.
- Fugier-Vivier, I. J., Rezzoug, F., Huang, Y., Graul-Layman, A. J., Schanie, C. L., Xu, H., Chilton, P. M., et Ildstad, S. T. (2005). Plasmacytoid precursor dendritic cells facilitate allogeneic hematopoietic stem cell engraftment. *J. Exp. Med* 201, 373-383.
- Fuller, K., Wong, B., Fox, S., Choi, Y., et Chambers, T. J. (1998). TRANCE is necessary and sufficient for

- osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med* 188, 997-1001.
- Gaidos, G., Soni, S., Oswald, D. J., Toselli, P. A., et Kirsch, K. H. (2007). Structure and function analysis of the CMS/CIN85 protein family identifies actin-bundling properties and heterotypic-complex formation. *J. Cell. Sci* 120, 2366-2377.
- Gallagher, G., Eskdale, J., Jordan, W., Peat, J., Campbell, J., Boniotto, M., Lennon, G. P., Dickensheets, H., et Donnelly, R. P. (2004). Human interleukin-19 and its receptor: a potential role in the induction of Th2 responses. *Int. Immunopharmacol* 4, 615-626.
- Gantner, B. N., Simmons, R. M., Canavera, S. J., Akira, S., et Underhill, D. M. (2003). Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J. Exp. Med* 197, 1107-1117.
- Garin, J., Diez, R., Kieffer, S., Dermine, J. F., Duclos, S., Gagnon, E., Sadoul, R., Rondeau, C., et Desjardins, M. (2001). The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J. Cell Biol* 152, 165-180.
- Geijtenbeek, T. B., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Adema, G. J., van Kooyk, Y., et Figdor, C. G. (2000a). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100, 575-585.
- Geijtenbeek, T. B., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Adema, G. J., van Kooyk, Y., et Figdor, C. G. (2000b). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100, 575-585.
- Geissmann, F., Launay, P., Pasquier, B., Lepelletier, Y., Leborgne, M., Lehuen, A., Brousse, N., et Monteiro, R. C. (2001). A subset of human dendritic cells expresses IgA Fc receptor (CD89), which mediates internalization and activation upon cross-linking by IgA complexes. *J. Immunol* 166, 346-352.
- Georgopoulos, K., Bigby, M., Wang, J. H., Molnar, A., Wu, P., Winandy, S., et Sharpe, A. (1994). The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* 79, 143-156.
- Gerosa, F., Gobbi, A., Zorzi, P., Burg, S., Briere, F., Carra, G., et Trinchieri, G. (2005). The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *J. Immunol* 174, 727-734.
- GeurtsvanKessel, C. H., et Lambrecht, B. N. (2008). Division of labor between dendritic cell subsets of the lung. *Mucosal Immunol* 1, 442-450.
- 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.

- 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., Tacke, F., Angeli, V., Bogunovic, M., Loubeau, M., Dai, X., Stanley, E. R., Randolph, G. J., et Merad, M. (2006). Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat. Immunol* *7*, 265-273.
- Gorny, G., Shaw, A., et Oursler, M. J. (2004). IL-6, LIF, and TNF-alpha regulation of GM-CSF inhibition of osteoclastogenesis in vitro. *Exp. Cell Res* *294*, 149-158.
- Gottenberg, J., Cagnard, N., Lucchesi, C., Letourneur, F., Mistou, S., Lazure, T., Jacques, S., Ba, N., Ittah, M., Lepajolec, C., et al. (2006). Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjögren's syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *103*, 2770-2775.
- Goubier, A., Dubois, B., Gheit, H., Joubert, G., Villard-Truc, F., Asselin-Paturel, C., Trinchieri, G., et Kaiserlian, D. (2008). Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity* *29*, 464-475.
- Grandvaux, N., tenOever, B. R., Servant, M. J., et Hiscott, J. (2002). The interferon antiviral response: from viral invasion to evasion. *Curr. Opin. Infect. Dis* *15*, 259-267.
- Groot, F., van Capel, T. M. M., Kapsenberg, M. L., Berkhout, B., et de Jong, E. C. (2006). Opposing roles of blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in HIV-1 infection of T cells: transmission facilitation versus replication inhibition. *Blood* *108*, 1957-1964.
- 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.
- Guerrier, S., Coutinho-Budd, J., Sassa, T., Gresset, A., Jordan, N. V., Chen, K., Jin, W., Frost, A., et Polleux, F. (2009). The F-BAR domain of srGAP2 induces membrane protrusions required for neuronal migration and morphogenesis. *Cell* *138*, 990-1004.
- Guillonnet, C., Louvet, C., Renaudin, K., Heslan, J. M., Heslan, M., Tesson, L., Vignes, C., Guillot, C., Choi, Y., Turka, L. A., et al. (2004). The role of TNF-related activation-induced cytokine-receptor activating NF-kappa B interaction in acute allograft rejection and CD40L-independent chronic allograft rejection. *J Immunol* *172*, 1619-29.
- 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.
- Gutzmer, R., Köther, B., Zwirner, J., Dijkstra, D., Purwar, R., Wittmann, M., et Werfel, T. (2006). Human plasmacytoid dendritic cells

- express receptors for anaphylatoxins C3a and C5a and are chemoattracted to C3a and C5a. *J. Invest. Dermatol* *126*, 2422-2429.
- Haas, T., Metzger, J., Schmitz, F., Heit, A., Müller, T., Latz, E., et Wagner, H. (2008). The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. *Immunity* *28*, 315-323.
- Hadeiba, H., Sato, T., Habtezion, A., Oderup, C., Pan, J., et Butcher, E. C. (2008a). CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nat. Immunol* *9*, 1253-1260.
- Hadeiba, H., Sato, T., Habtezion, A., Oderup, C., Pan, J., et Butcher, E. C. (2008b). CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nat. Immunol* *9*, 1253-1260.
- Haller, O., et Kochs, G. (2002). Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic* *3*, 710-717.
- Hanada, R., Leibbrandt, A., Hanada, T., Kitaoka, S., Furuyashiki, T., Fujihara, H., Trichereau, J., Paolino, M., Qadri, F., Plehm, R., et al. (2009). Central control of fever and female body temperature by RANKL/RANK. *Nature* *462*, 505-509.
- Hardy, A. W., Graham, D. R., Shearer, G. M., et Herbeuval, J. (2007). HIV turns plasmacytoid dendritic cells (pDC) into TRAIL-expressing killer pDC and down-regulates HIV coreceptors by Toll-like receptor 7-induced IFN-alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *104*, 17453-17458.
- Hasan, U., Chaffois, C., Gaillard, C., Saulnier, V., Merck, E., Tancredi, S., Guiet, C., Brière, F., Vlach, J., Lebecque, S., et al. (2005). Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J. Immunol* *174*, 2942-2950.
- Hathcock, K. S., Laszlo, G., Pucillo, C., Linsley, P., et Hodes, R. J. (1994). Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J. Exp. Med* *180*, 631-640.
- 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.
- Heil, F., Ahmad-Nejad, P., Hemmi, H.,

- Hochrein, H., Ampenberger, F., Gellert, T., Dietrich, H., Lipford, G., Takeda, K., Akira, S., et al. (2003). The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus Ixoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur. J. Immunol* 33, 2987-2997.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., et al. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-745.
- Hemmi, H., Yoshino, M., Yamazaki, H., Naito, M., Iyoda, T., Omatsu, Y., Shimoyama, S., Letterio, J. J., Nakabayashi, T., Tagaya, H., et al. (2001). Skin antigens in the steady state are trafficked to regional lymph nodes by transforming growth factor-beta1-dependent cells. *Int. Immunol* 13, 695-704.
- Herbeuval, J., Boasso, A., Grivel, J., Hardy, A. W., Anderson, S. A., Dolan, M. J., Chougnat, C., Lifson, J. D., et Shearer, G. M. (2005). TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in HIV-1-infected patients and its in vitro production by antigen-presenting cells. *Blood* 105, 2458-2464.
- Herbeuval, J., Nilsson, J., Boasso, A., Hardy, A. W., Kruhlak, M. J., Anderson, S. A., Dolan, M. J., Dy, M., Andersson, J., et Shearer, G. M. (2006). Differential expression of IFN-alpha and TRAIL/DR5 in lymphoid tissue of progressor versus nonprogressor HIV-1-infected patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 103, 7000-7005.
- Herman, S., Krönke, G., et Schett, G. (2008). Molecular mechanisms of inflammatory bone damage: emerging targets for therapy. *Trends Mol Med* 14, 245-253.
- Herre, J., Marshall, A. S. J., Caron, E., Edwards, A. D., Williams, D. L., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Reis e Sousa, C., Gordon, S., et Brown, G. D. (2004). Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. *Blood* 104, 4038-4045.
- Heusel, J. W., Wesselschmidt, R. L., Shresta, S., Russell, J. H., et Ley, T. J. (1994). Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* 76, 977-987.
- Hibbert, L., Pflanz, S., De Waal Malefyt, R., et Kastelein, R. A. (2003). IL-27 and IFN-alpha signal via Stat1 and Stat3 and induce T-Bet and IL-12Rbeta2 in naive T cells. *J. Interferon Cytokine Res* 23, 513-522.
- Hirschfeld, M., Weis, J. J., Toshchakov, V., Salkowski, C. A., Cody, M. J., Ward, D. C., Qureshi, N., Michalek, S. M., et Vogel, S. N. (2001). Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect. Immun* 69, 1477-1482.
- Hoe, H., Lee, K. J., Carney, R. S. E., Lee, J., Markova, A., Lee, J., Howell, B. W., Hyman, B. T., Pak, D. T. S., Bu, G., et al. (2009). Interaction of reelin with amyloid precursor protein promotes neurite outgrowth. *J. Neurosci* 29, 7459-7473.

- Hoeffel, G., Ripoche, A., Matheoud, D., Nascimbeni, M., Escriou, N., Lebon, P., Heshmati, F., Guillet, J., Gannagé, M., Caillat-Zucman, S., et al. (2007). Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 27, 481-492.
- Hofbauer, L. C., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Spelsberg, T. C., Riggs, B. L., et Khosla, S. (1999). Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone* 25, 255-259.
- Hofmann, M. A., Kors, C., Audring, H., Walden, P., Sterry, W., et Trefzer, U. (2008). Phase 1 evaluation of intralesionally injected TLR9-agonist PF-3512676 in patients with basal cell carcinoma or metastatic melanoma. *J. Immunother* 31, 520-527.
- Holen, I., Croucher, P. I., Hamdy, F. C., et Eaton, C. L. (2002). Osteoprotegerin (OPG) is a survival factor for human prostate cancer cells. *Cancer Res* 62, 1619-1623.
- Honda, K., Ohba, Y., Yanai, H., Negishi, H., Mizutani, T., Takaoka, A., Taya, C., et Taniguchi, T. (2005). Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* 434, 1035-1040.
- Honda, K., Yanai, H., Mizutani, T., Negishi, H., Shimada, N., Suzuki, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yeh, W., et Taniguchi, T. (2004). Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 101, 15416-15421.
- Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., de Fougères, A., et al. (2005). Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat. Med* 11, 263-270.
- Horwood, N. J., Elliott, J., Martin, T. J., et Gillespie, M. T. (1998). Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells. *Endocrinology* 139, 4743-4746.
- 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.
- 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*

- Hvas, J., McLean, C., Justesen, J., Kannourakis, G., Steinman, L., Oksenberg, J. R., et Bernard, C. C. (1997). Perivascular T cells express the pro-inflammatory chemokine RANTES mRNA in multiple sclerosis lesions. *Scand. J. Immunol* *46*, 195-203.
- Ikeda, T., Kasai, M., Utsuyama, M., et Hirokawa, K. (2001). Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology* *142*, 1419-1426.
- Imai, T., Koike, K., Kubo, T., Kikuchi, T., Amano, Y., Takagi, M., Okumura, N., et Nakahata, T. (1991). Interleukin-6 supports human megakaryocytic proliferation and differentiation in vitro. *Blood* *78*, 1969-1974.
- Inaba, K., Inaba, M., Naito, M., et Steinman, R. M. (1993). Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J. Exp. Med* *178*, 479-488.
- Isaksson, M., Ardesjö, B., Rönnblom, L., Kämpe, O., Lassmann, H., Eloranta, M., et Lobell, A. (2009). Plasmacytoid DC promote priming of autoimmune Th17 cells and EAE. *Eur. J. Immunol* *39*, 2925-2935.
- Ito, T., Amakawa, R., Inaba, M., Ikehara, S., Inaba, K., et Fukuhara, S. (2001). Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by IFNs. *J. Immunol* *166*, 2961-
- Ito, T., Amakawa, R., Inaba, M., Hori, T., Ota, M., Nakamura, K., Takebayashi, M., Miyaji, M., Yoshimura, T., Inaba, K., et al. (2004). Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs. *J. Immunol* *172*, 4253-4259.
- Ito, T., Yang, M., Wang, Y., Lande, R., Gregorio, J., Perng, O. A., Qin, X., Liu, Y., et Gilliet, M. (2007). Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J. Exp. Med* *204*, 105-115.
- Jahrsdörfer, B., Vollmer, A., Blackwell, S. E., Maier, J., Sontheimer, K., Beyer, T., Mandel, B., Lunov, O., Tron, K., Nienhaus, G. U., et al. (2010). Granzyme B produced by human plasmacytoid dendritic cells suppresses T-cell expansion. *Blood* *115*, 1156-1165.
- Jaworski, A., Long, H., et Tessier-Lavigne, M. (2010). Collaborative and specialized functions of Robo1 and Robo2 in spinal commissural axon guidance. *J. Neurosci* *30*, 9445-9453.
- Jego, G., Palucka, A. K., Blanck, J., Chalouni, C., Pascual, V., et Banchereau, J. (2003). Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* *19*, 225-234.
- Jewell, N. A., Vaghefi, N., Mertz, S. E., Akter, P., Peebles, R. S., Bakaletz, L. O., Durbin, R. K., Flaño, E., et Durbin, J. E. (2007). Differential type I interferon induction by respiratory syncytial virus and influenza A virus in vivo. *J. Virol*

- 81, 9790-9800.
- Ji, Q., Guo, M., Zheng, J., Mao, X., Peng, Y., Li, S., Liang, Z., Dai, Z., Mao, Y., et Zeng, Q. (2009). Downregulation of T helper cell type 3 in patients with acute coronary syndrome. *Arch. Med. Res* 40, 285-293.
- Jiang, W., Swiggard, W. J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R. M., et Nussenzweig, M. C. (1995). The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375, 151-155.
- Josien, R., Heslan, M., Soulillou, J. P., et Cuturi, M. C. (1997). Rat spleen dendritic cells express natural killer cell receptor protein 1 (NKR-P1) and have cytotoxic activity to select targets via a Ca<sup>2+</sup>-dependent mechanism. *J Exp Med* 186, 467-72.
- Josien, R., Li, H. L., Ingulli, E., Sarma, S., Wong, B. R., Vologodskaja, M., Steinman, R. M., et Choi, Y. (2000). TRANCE, a tumor necrosis factor family member, enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 191, 495-502.
- Josien, R., Wong, B. R., Li, H. L., Steinman, R. M., et Choi, Y. (1999). TRANCE, a TNF family member, is differentially expressed on T cell subsets and induces cytokine production in dendritic cells. *J Immunol* 162, 2562-8.
- Joyce, S., et Van Kaer, L. (2003). CD1-restricted antigen presentation: an oily matter. *Curr. Opin. Immunol* 15, 95-104.
- 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.
- Kadowaki, N., Antonenko, S., Lau, J. Y., et Liu, Y. J. (2000). Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J. Exp. Med* 192, 219-226.
- Kamogawa-Schifter, Y., Ohkawa, J., Namiki, S., Arai, N., Arai, K., et Liu, Y. (2005). Ly49Q defines 2 pDC subsets in mice. *Blood* 105, 2787-2792.
- Kartsogiannis, V., Zhou, H., Horwood, N. J., Thomas, R. J., Hards, D. K., Quinn, J. M., Niforas, P., Ng, K. W., Martin, T. J., et Gillespie, M. T. (1999). Localization of RANKL (receptor activator of NF kappa B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskelatal tissues. *Bone* 25, 525-534.
- Kato, M., Neil, T. K., Clark, G. J., Morris, C. M., Sorg, R. V., et Hart, D. N. (1998). cDNA cloning of human DEC-205, a putative antigen-uptake receptor on dendritic cells. *Immunogenetics* 47, 442-450.
- 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. (2007). TLR signaling. *Semin. Immunol* 19, 24-

- 32.
- Kawai, T., Matsuyama, T., Hosokawa, Y., Makihira, S., Seki, M., Karimbux, N. Y., Goncalves, R. B., Valverde, P., Dibart, S., Li, Y., et al. (2006). B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am. J. Pathol* 169, 987-998.
- Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Nakayama, M., Eto, H., Okumura, K., et Yagita, H. (1999). Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs. *J. Exp. Med* 189, 1451-1460.
- Kerschen, E., Hernandez, I., Zogg, M., Jia, S., Hessner, M. J., Fernandez, J., Griffin, J. H., Huettner, C. S., Castellino, F. J., et Weiler, H. (2010). Activated protein C targets CD8+ dendritic cells to reduce the mortality of endotoxemia in mice. *J Clin Invest*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/20714108> [Accédé Août 25, 2010].
- Kim, K., Kim, J. H., Lee, J., Jin, H., Lee, S., Fisher, D. E., Kook, H., Kim, K. K., Choi, Y., et Kim, N. (2005a). Nuclear factor of activated T cells c1 induces osteoclast-associated receptor gene expression during tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine-mediated osteoclastogenesis. *J. Biol. Chem* 280, 35209-35216.
- Kim, N., Kadono, Y., Takami, M., Lee, J., Lee, S. H., Okada, F., Kim, J. H., Kobayashi, T., Odgren, P. R., Nakano, H., et al. (2005b). Osteoclast differentiation independent of the TRANCE-RANK-TRAF6 axis. *J Exp Med* 202, 589-95.
- Kirstetter, P., Thomas, M., Dierich, A., Kastner, P., et Chan, S. (2002). Ikaros is critical for B cell differentiation and function. *Eur. J. Immunol* 32, 720-730.
- Klejna, K., Naumnik, B., Gasowska, K., et Myśliwiec, M. (2009). OPG/RANK/RANKL signaling system and its significance in nephrology. *Folia Histochem. Cytobiol* 47, 199-206.
- Knoop, K. A., Kumar, N., Butler, B. R., Sakhivel, S. K., Taylor, R. T., Nochi, T., Akiba, H., Yagita, H., Kiyono, H., et Williams, I. R. (2009). RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium. *J. Immunol* 183, 5738-5747.
- Kobayashi, Y. (2006). Neutrophil infiltration and chemokines. *Crit. Rev. Immunol* 26, 307-316.
- Kong, Y. Y., Boyle, W. J., et Penninger, J. M. (1999). Osteoprotegerin ligand: a common link between osteoclastogenesis, lymph node formation and lymphocyte development. *Immunol Cell Biol* 77, 188-93.
- van Kooyk, Y., et Geijtenbeek, T. B. H. (2003). DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat. Rev. Immunol* 3, 697-709.
- Kopp, R., Fichter, M., Schalhorn, G., Danescu, J., et Classen, S. (2009). Frequent expression of the high molecular, 673-bp CD44v3,v8-10 variant in colorectal adenomas and

- carcinomas. *Int. J. Mol. Med* 24, 677-683.
- Kotake, S., Udagawa, N., Takahashi, N., Matsuzaki, K., Itoh, K., Ishiyama, S., Saito, S., Inoue, K., Kamatani, N., Gillespie, M. T., et al. (1999). IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J. Clin. Invest* 103, 1345-1352.
- Kramer, J. M., et Gaffen, S. L. (2007). Interleukin-17: A New Paradigm in Inflammation, Autoimmunity, and Therapy. *Journal of Periodontology* 78, 1083-1093.
- Krauss, S., Mayer, E., Rank, G., et Rieber, E. P. (1993). Induction of the low affinity receptor for IgE (Fc epsilon RII/CD23) on human blood dendritic cells by interleukin-4. *Adv. Exp. Med. Biol* 329, 231-236.
- Krug, A., French, A. R., Barchet, W., Fischer, J. A. A., Dzionek, A., Pingel, J. T., Orihuela, M. M., Akira, S., Yokoyama, W. M., et Colonna, M. (2004a). TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* 21, 107-119.
- Krug, A., Luker, G. D., Barchet, W., Leib, D. A., Akira, S., et Colonna, M. (2004b). Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* 103, 1433-1437.
- 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.
- Krüger, T., Benke, D., Eitner, F., Lang, A., Wirtz, M., Hamilton-Williams, E. E., Engel, D., Giese, B., Müller-Newen, G., Floege, J., et al. (2004). Identification and functional characterization of dendritic cells in the healthy murine kidney and in experimental glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol* 15, 613-621.
- Kurschus, F. C., Bruno, R., Fellows, E., Falk, C. S., et Jenne, D. E. (2005). Membrane receptors are not required to deliver granzyme B during killer cell attack. *Blood* 105, 2049-2058.
- Kurt-Jones, E. A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L. M., Jones, L. P., Tripp, R. A., Walsh, E. E., Freeman, M. W., Golenbock, D. T., Anderson, L. J., et al. (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat. Immunol* 1, 398-401.
- Kuwajima, S., Sato, T., Ishida, K., Tada, H., Tezuka, H., et Ohteki, T. (2006). Interleukin 15-dependent crosstalk between conventional and plasmacytoid dendritic cells is essential for CpG-induced immune activation. *Nat. Immunol* 7, 740-746.
- Kuwana, M., Kaburaki, J., Wright, T. M., Kawakami, Y., et Ikeda, Y. (2001). Induction of antigen-specific human CD4(+) T cell anergy by peripheral blood DC2 precursors. *Eur. J. Immunol* 31, 2547-2557.
- Lacey, D. L., Timms, E., Tan, H. L., Kelley, M. J., Dunstan, C. R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero,

- A., Elliott, G., Scully, S., et al. (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93, 165-76.
- Lamoureux, F., Richard, P., Wittrant, Y., Battaglia, S., Pilet, P., Trichet, V., Blanchard, F., Gouin, F., Pitard, B., Heymann, D., et al. (2007). Therapeutic relevance of osteoprotegerin gene therapy in osteosarcoma: blockade of the vicious cycle between tumor cell proliferation and bone resorption. *Cancer Res* 67, 7308-7318.
- Lande, R., Gafa, V., Serafini, B., Giacomini, E., Visconti, A., Remoli, M. E., Severa, M., Parmentier, M., Ristori, G., Salvetti, M., et al. (2008). Plasmacytoid dendritic cells in multiple sclerosis: intracerebral recruitment and impaired maturation in response to interferon-beta. *J. Neuropathol. Exp. Neurol* 67, 388-401.
- Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V., Chatterjee, B., Wang, Y., Homey, B., Cao, W., Wang, Y., Su, B., Nestle, F. O., et al. (2007). Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 449, 564-569.
- Lane, P. J., Kim, M. Y., Gaspal, F. M., et McConnell, F. M. (2006). CD4+CD3- cells regulate the organization of lymphoid tissue and T-cell memory for antibody responses. *Int J Hematol* 83, 12-6.
- Langerhans, P. (1868). Ueber die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Archiv* 44, 325-337.
- Langlois, R. A., et Legge, K. L. (2010). Plasmacytoid dendritic cells enhance mortality during lethal influenza infections by eliminating virus-specific CD8 T cells. *J. Immunol* 184, 4440-4446.
- Le Bon, A., Etchart, N., Rossmann, C., Ashton, M., Hou, S., Gewert, D., Borrow, P., et Tough, D. F. (2003). Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat. Immunol* 4, 1009-1015.
- Leach, D. R., Krummel, M. F., et Allison, J. P. (1996). Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271, 1734-1736.
- Lee, H. K., Lund, J. M., Ramanathan, B., Mizushima, N., et Iwasaki, A. (2007). Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science* 315, 1398-1401.
- LeibundGut-Landmann, S., Waldburger, J., Reis e Sousa, C., Acha-Orbea, H., et Reith, W. (2004). MHC class II expression is differentially regulated in plasmacytoid and conventional dendritic cells. *Nat. Immunol* 5, 899-908.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J., et Hoffmann, J. A. (1996). The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. *Cell* 86, 973-983.
- LENNERT, K., et REMMELE, W. (1958). [Karyometric research on lymph node cells in man. I. Germinoblasts, lymphoblasts & lymphocytes.]. *Acta Haematol* 19, 99-113.

- Leulier, F., et Lemaitre, B. (2008). Toll-like receptors--taking an evolutionary approach. *Nat. Rev. Genet* 9, 165-178.
- Levings, M. K., Sangregorio, R., Galbiati, F., Squadrone, S., de Waal Malefyt, R., et Roncarolo, M. G. (2001). IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J. Immunol* 166, 5530-5539.
- Li, J., Sarosi, I., Yan, X. Q., Morony, S., Capparelli, C., Tan, H. L., McCabe, S., Elliott, R., Scully, S., Van, G., et al. (2000). RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97, 1566-1571.
- Liu, C., Lou, Y., Lizée, G., Qin, H., Liu, S., Rabinovich, B., Kim, G. J., Wang, Y., Ye, Y., Sikora, A. G., et al. (2008). Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice. *J. Clin. Invest* 118, 1165-1175.
- Liu, H., Rhodes, M., Wiest, D. L., et Vignali, D. A. (2000). On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. *Immunity* 13, 665-675.
- Liu, K., Victora, G. D., Schwickert, T. A., Guermonprez, 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. (2005). IPC: Professional Type 1 Interferon-Producing Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 275-306.
- López de Padilla, C. M., Vallejo, A. N., McNallan, K. T., Vehe, R., Smith, S. A., Dietz, A. B., Vuk-Pavlovic, S., et Reed, A. M. (2007). Plasmacytoid dendritic cells in inflamed muscle of patients with juvenile dermatomyositis. *Arthritis Rheum* 56, 1658-1668.
- Loser, K., Mehling, A., Loeser, S., Apelt, J., Kuhn, A., Grabbe, S., Schwarz, T., Penninger, J. M., et Beissert, S. (2006). Epidermal RANKL controls regulatory T-cell numbers via activation of dendritic cells. *Nat. Med* 12, 1372-1379.
- Lowes, M. A., Chamian, F., Abello, M. V., Fuentes-Duculan, J., Lin, S., Nussbaum, R., Novitskaya, I., Carbonaro, H., Cardinale, I., Kikuchi, T., et al. (2005). Increase in TNF-alpha and inducible nitric oxide synthase-expressing dendritic cells in psoriasis and reduction with efalizumab (anti-CD11a). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102, 19057-19062.
- Lum, L., Wong, B. R., Josien, R., Becherer, J. D., Erdjument-Bromage, H., Schlöndorff, J., Tempst, P., Choi, Y., et Blobel, C. P. (1999a). Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J. Biol. Chem* 274, 13613-13618.
- Lum, L., Wong, B. R., Josien, R., Becherer, J. D., Erdjument-Bromage, H., Schlöndorff, J., Tempst, P., Choi, Y., et Blobel, C.

- P. (1999b). Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J Biol Chem* *274*, 13613-8.
- Lund, J. M., Linehan, M. M., Iijima, N., et Iwasaki, A. (2006). Cutting Edge: Plasmacytoid dendritic cells provide innate immune protection against mucosal viral infection in situ. *J. Immunol* *177*, 7510-7514.
- Ma, D. Y., et Clark, E. A. (2009). The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. *Semin. Immunol* *21*, 265-272.
- Malek, T. R., et Bayer, A. L. (2004). Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat. Rev. Immunol* *4*, 665-674.
- Manches, O., Munn, D., Fallahi, A., Lifson, J., Chaperot, L., Plumas, J., et Bhardwaj, N. (2008). HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism. *J. Clin. Invest* *118*, 3431-3439.
- Manetti, R., Parronchi, P., Giudizi, M. G., Piccinni, M. P., Maggi, E., Trinchieri, G., et Romagnani, S. (1993). Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J. Exp. Med* *177*, 1199-1204.
- Mangan, P. R., Harrington, L. E., O'Quinn, D. B., Helms, W. S., Bullard, D. C., Elson, C. O., Hatton, R. D., Wahl, S. M., Schoeb, T. R., et Weaver, C. T. (2006). Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* *441*, 231-234.
- Marafioti, T., Paterson, J. C., Ballabio, E., Reichard, K. K., Tedoldi, S., Hollowood, K., Dictor, M., Hansmann, M., Pileri, S. A., Dyer, M. J., et al. (2008). Novel markers of normal and neoplastic human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* *111*, 3778-3792.
- Matsui, T., Connolly, J. E., Michnevitz, M., Chaussabel, D., Yu, C., Glaser, C., Tindle, S., Pypaert, M., Freitas, H., Piqueras, B., et al. (2009). CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions. *J. Immunol* *182*, 6815-6823.
- Matzinger, P. (2002). An innate sense of danger. *Ann. N. Y. Acad. Sci* *961*, 341-342.
- Mazerolles, F., Barbat, C., Hivroz, C., et Fischer, A. (1996). Phosphatidylinositol 3-kinase participates in p56(lck)/CD4-dependent down-regulation of LFA-1-mediated T cell adhesion. *J. Immunol* *157*, 4844-4854.
- McLellan, A. D., Heiser, A., Sorg, R. V., Fearnley, D. B., et Hart, D. N. (1998). Dermal dendritic cells associated with T lymphocytes in normal human skin display an activated phenotype. *J. Invest. Dermatol* *111*, 841-849.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., et Janeway, C. A. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* *388*, 394-397.

- Megjugorac, N. J., Young, H. A., Amrute, S. B., Olshalsky, S. L., et Fitzgerald-Bocarsly, P. (2004). Virally stimulated plasmacytoid dendritic cells produce chemokines and induce migration of T and NK cells. *J. Leukoc. Biol* 75, 504-514.
- Mellor, A. L., Baban, B., Chandler, P., Marshall, B., Jhaver, K., Hansen, A., Koni, P. A., Iwashima, M., et Munn, D. H. (2003). Cutting edge: induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. *J. Immunol* 171, 1652-1655.
- Menéndez-Benito, V., et Neefjes, J. (2007). Autophagy in MHC class II presentation: sampling from within. *Immunity* 26, 1-3.
- Meyers, J. H., Justement, J. S., Hallahan, C. W., Blair, E. T., Sun, Y. A., O'Shea, M. A., Roby, G., Kottlil, S., Moir, S., Kovacs, C. M., et al. (2007). Impact of HIV on cell survival and antiviral activity of plasmacytoid dendritic cells. *PLoS ONE* 2, e458.
- Meylan, E., Tschopp, J., et Karin, M. (2006). Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 442, 39-44.
- Mohty, M., Vialle-Castellano, A., Nunes, J. A., Isnardon, D., Olive, D., et Gaugler, B. (2003). IFN-alpha skews monocyte differentiation into Toll-like receptor 7-expressing dendritic cells with potent functional activities. *J. Immunol* 171, 3385-3393.
- Moll, H., Fuchs, H., Blank, C., et Röllinghoff, M. (1993). Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur. J. Immunol* 23, 1595-1601.
- Monks, C. R., Freiberg, B. A., Kupfer, H., Sciaky, N., et Kupfer, A. (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395, 82-86.
- 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., 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.
- Nakagawa, I., Amano, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Yamaguchi, H., Kamimoto, T., Nara, A., Funao, J., Nakata, M., Tsuda, K., et al. (2004). Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*. *Science* 306, 1037-1040.
- 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.
- Naquet, P., Ellis, J., Tibensky, D., Kenshole, A., Singh, B., Hodges, R., et Delovitch, T. L. (1988). T cell autoreactivity to insulin in diabetic and related non-diabetic individuals. *J. Immunol* 140, 2569-2578.
- Nasarre, P., Constantin, B., Drabkin, H. A., et Roche, J. (2005). [Semaphorins and cancers : an up 'dating']. *Med Sci (Paris)* 21, 641-647.
- Negishi, H., Ohba, Y., Yanai, H., Takaoka, A., Honma, K., Yui, K., Matsuyama, T., Taniguchi, T., et Honda, K. (2005). Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF-4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102, 15989-15994.
- Neijssen, J., Pang, B., et Neefjes, J. (2007). Gap junction-mediated intercellular communication in the immune system. *Prog. Biophys. Mol. Biol* 94, 207-218.
- Nestle, F. O., Conrad, C., Tun-Kyi, A., Homey, B., Gombert, M., Boyman, O., Burg, G., Liu, Y., et Gilliet, M. (2005). Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J. Exp. Med* 202, 135-143.
- Neville-Webbe, H. L., Cross, N. A., Eaton, C. L., Nyambo, R., Evans, C. A., Coleman, R. E., et Holen, I. (2004). Osteoprotegerin (OPG) produced by bone marrow stromal cells protects breast cancer cells from TRAIL-induced apoptosis. *Breast Cancer Res. Treat* 86, 269-279.
- Nichols, A. J., et Olson, E. C. (2010). Reelin Promotes Neuronal Orientation and Dendritogenesis during Preplate Splitting. *Cereb. Cortex* 20, 2213-2223.
- Nickel, T., Schmauss, D., Hanssen, H., Sicic, Z., Krebs, B., Jankl, S., Summo, C., Fraunberger, P., Walli, A. K., Pfeiler, S., et al. (2009). oxLDL uptake by dendritic cells induces upregulation of scavenger-receptors, maturation and differentiation. *Atherosclerosis* 205, 442-450.
- Nicolson, K. S., O'Neill, E. J., Sundstedt, A., Streeter, H. B., Minaee, S., et Wraith, D. C. (2006). Antigen-induced IL-10+ regulatory T cells are independent of CD25+ regulatory cells for their growth, differentiation, and function. *J. Immunol* 176, 5329-5337.
- Noel, L. S., Champion, B. R., Holley, C. L., Simmons, C. J., Morris, D. C., Payne, J. A., Lean, J. M., Chambers, T. J., Zaman, G., Lanyon, L. E., et al. (1998). RoBo-1, a novel member of the urokinase plasminogen activator receptor/CD59/Ly-6/snake toxin family selectively expressed in rat bone and growth plate cartilage. *J. Biol. Chem* 273, 3878-3883.
- Norbury, C. C. (2006). Drinking a lot is good for dendritic cells. *Immunology* 117, 443-451.
- 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.
- Oh, S. H., Bandyopadhyay, S., Miller, D. S., et Starr, S. E. (1987).

- Cooperation between CD16(Leu-11b)+ NK cells and HLA-DR+ cells in natural killing of herpesvirus-infected fibroblasts. *J. Immunol* *139*, 2799-2802.
- Ohl, L., Mohaupt, M., Czeloth, N., Hintzen, G., Kiafard, Z., Zwirner, J., Blankenstein, T., Henning, G., et Förster, R. (2004). CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity* *21*, 279-288.
- Onai, N., Obata-Onai, A., Schmid, M. A., Ohteki, T., Jarrossay, D., et Manz, M. G. (2007). Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat. Immunol* *8*, 1207-1216.
- Ong, G. L., et Mattes, M. J. (1989). Mouse strains with typical mammalian levels of complement activity. *J. Immunol. Methods* *125*, 147-158.
- Ouaaz, F., Arron, J., Zheng, Y., Choi, Y., et Beg, A. A. (2002). Dendritic cell development and survival require distinct NF-kappaB subunits. *Immunity* *16*, 257-270.
- Ouabed, A., Hubert, F. X., 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*, 5862-70.
- Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L., et Aderem, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *97*, 13766-13771.
- Padigel, U. M., Perrin, P. J., et Farrell, J. P. (2001). The development of a Th1-type response and resistance to *Leishmania major* infection in the absence of CD40-CD40L costimulation. *J. Immunol* *167*, 5874-5879.
- Padigel, U. M., Kim, N., Choi, Y., et Farrell, J. P. (2003). TRANCE-RANK costimulation is required for IL-12 production and the initiation of a Th1-type response to *Leishmania major* infection in CD40L-deficient mice. *J Immunol* *171*, 5437-41.
- Pageau, S. C. (2009). Denosumab. *MAbs* *1*, 210-215.
- Palamara, F., Meindl, S., Holcman, M., Lührs, P., Stingl, G., et Sibilina, M. (2004). Identification and characterization of pDC-like cells in normal mouse skin and melanomas treated with imiquimod. *J. Immunol* *173*, 3051-3061.
- Parolini, S., Santoro, A., Marcenaro, E., Luini, W., Massardi, L., Facchetti, F., Communi, D., Parmentier, M., Majorana, A., Sironi, M., et al. (2007). The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues. *Blood* *109*, 3625-3632.
- Penna, G., Vulcano, M., Sozzani, S., et Adorini, L. (2002). Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Hum. Immunol* *63*, 1164-1171.
- Perussia, B., Fanning, V., et Trinchieri, G. (1985). A leukocyte subset bearing

- HLA-DR antigens is responsible for in vitro alpha interferon production in response to viruses. *Nat. Immun. Cell Growth Regul* 4, 120-137.
- Piccioli, D., Sammicheli, C., Tavarini, S., Nuti, S., Frigimelica, E., Manetti, A. G. O., Nuccitelli, A., Aprea, S., Valentini, S., Borgogni, E., et al. (2009). Human plasmacytoid dendritic cells are unresponsive to bacterial stimulation and require a novel type of cooperation with myeloid dendritic cells for maturation. *Blood* 113, 4232-4239.
- Platt, N., da Silva, R. P., et Gordon, S. (1998). Class A scavenger receptors and the phagocytosis of apoptotic cells. *Biochem. Soc. Trans* 26, 639-644.
- Ploegh, H. L. (2007). A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. *Nature* 448, 435-438.
- Ponta, H., Sherman, L., et Herrlich, P. A. (2003). CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 4, 33-45.
- Pulendran, B. (2004). Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors. *Immunol. Rev* 199, 227-250.
- Pulford, K., Banham, A. H., Lyne, L., Jones, M., Ippolito, G. C., Liu, H., Tucker, P. W., Roncador, G., Lucas, E., Ashe, S., et al. (2006). The BCL11AXL transcription factor: its distribution in normal and malignant tissues and use as a marker for plasmacytoid dendritic cells. *Leukemia* 20, 1439-1441.
- Reis e Sousa, C., Stahl, P. D., et Austyn, J. M. (1993). Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J. Exp. Med* 178, 509-519.
- Reizis, B., Schramm, C., Cohen, I. R., et Mor, F. (1994). Expression of major histocompatibility complex class II molecules in rat T cells. *Eur. J. Immunol* 24, 2796-2802.
- Rodríguez-Fernández, J. L., Riol-Blanco, L., et Delgado-Martín, C. (2010). What is the function of the dendritic cell side of the immunological synapse? *Sci Signal* 3, re2.
- Rönblom, L., Ramstedt, U., et Alm, G. V. (1983). Properties of human natural interferon-producing cells stimulated by tumor cell lines. *Eur. J. Immunol* 13, 471-476.
- Rothenfusser, S., Hornung, V., Ayyoub, M., Britsch, S., Towarowski, A., Krug, A., Sarris, A., Lubenow, N., Speiser, D., Endres, S., et al. (2004). CpG-A and CpG-B oligonucleotides differentially enhance human peptide-specific primary and memory CD8+ T-cell responses in vitro. *Blood* 103, 2162-2169.
- Rubartelli, A., Poggi, A., et Zocchi, M. R. (1997). The selective engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells is mediated by the alpha(v)beta3 integrin and requires intracellular and extracellular calcium. *Eur. J. Immunol* 27, 1893-1900.
- Ruf, W. (2010). New players in the sepsis-protective activated protein C pathway. *J Clin Invest*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov.gate2.inist.fr/pubmed/20714106> [Accédé Août 25, 2010].
- Ryś, J., Kruczak, A., Lackowska, B.,

- Jaszcz-Gruchala, A., Brandys, A., Stelmach, A., et Reinfuss, M. (2003). The role of CD44v3 expression in female breast carcinomas. *Pol J Pathol* 54, 243-247.
- Saksela, E., Virtanen, I., Hovi, T., Secher, D. S., et Cantell, K. (1984). Monocyte is the main producer of human leukocyte alpha interferons following Sendai virus induction. *Prog. Med. Virol* 30, 78-86.
- 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.
- Sallusto, F., Palermo, B., Lenig, D., Miettinen, M., Matikainen, S., Julkunen, I., Forster, R., Burgstahler, R., Lipp, M., et Lanzavecchia, A. (1999). Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur. J. Immunol* 29, 1617-1625.
- Sandgren, K. J., Wilkinson, J., Miranda-Saksena, M., McInerney, G. M., Byth-Wilson, K., Robinson, P. J., et Cunningham, A. L. (2010). A differential role for macropinocytosis in mediating entry of the two forms of vaccinia virus into dendritic cells. *PLoS Pathog* 6, e1000866.
- 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.
- Sato, K., Hida, S., Takayanagi, H., Yokochi, T., Kayagaki, N., Takeda, K., Yagita, H., Okumura, K., Tanaka, N., Taniguchi, T., et al. (2001). Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta. *Eur. J. Immunol* 31, 3138-3146.
- Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y., Tanaka, S., Kodama, T., Akira, S., Iwakura, Y., et al. (2006a). Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J. Exp. Med* 203, 2673-2682.
- Sato, K., Yang, X., Yudate, T., Chung, J., Wu, J., Luby-Phelps, K., Kimberly, R. P., Underhill, D., Cruz, P. D., et Ariizumi, K. (2006b). Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses. *J. Biol. Chem* 281, 38854-38866.

- Saurer, L., et Mueller, C. (2009). T cell-mediated immunoregulation in the gastrointestinal tract. *Allergy* *64*, 505-519.
- Schmid, D., et Münz, C. (2005). Immune surveillance of intracellular pathogens via autophagy. *Cell Death Differ* *12 Suppl 2*, 1519-1527.
- Schmid, D., et Münz, C. (2007). Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity* *27*, 11-21.
- Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T. K., Zurawski, G., Moshrefi, M., Qin, J., Li, X., et al. (2005). IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* *23*, 479-490.
- Schnurr, M., Toy, T., Shin, A., Hartmann, G., Rothenfusser, S., Soellner, J., Davis, I. D., Cebon, J., et Maraskovsky, E. (2004). Role of adenosine receptors in regulating chemotaxis and cytokine production of plasmacytoid dendritic cells. *Blood* *103*, 1391-1397.
- Schotte, R., Nagasawa, M., Weijer, K., Spits, H., et Blom, B. (2004). The ETS transcription factor Spi-B is required for human plasmacytoid dendritic cell development. *J. Exp. Med* *200*, 1503-1509.
- Schwab, N., Zozulya, A. L., Kieseier, B. C., Toyka, K. V., et Wiendl, H. (2010). An imbalance of two functionally and phenotypically different subsets of plasmacytoid dendritic cells characterizes the dysfunctional immune regulation in multiple sclerosis. *J. Immunol* *184*, 5368-5374.
- 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.
- Seiter, S., Schadendorf, D., Tilgen, W., et Zöller, M. (1998). CD44 variant isoform expression in a variety of skin-associated autoimmune diseases. *Clin. Immunol. Immunopathol* *89*, 79-93.
- Seki, T., Moriuchi, T., Chang, H. C., Denome, R., et Silver, J. (1985). Structural organization of the rat thy-1 gene. *Nature* *313*, 485-487.
- 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.
- Serbina, N. V., Jia, T., Hohl, T. M., et Pamer, E. G. (2008). Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. *Annu. Rev. Immunol.* *26*, 421-452.
- Sharma, M. D., Baban, B., Chandler, P., Hou, D., Singh, N., Yagita, H., Azuma, M., Blazar, B. R., Mellor, A. L., et Munn, D. H. (2007a). Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest* *117*, 2570-2582.
- Sharma, M. D., Baban, B., Chandler, P., Hou, D., Singh, N., Yagita, H., Azuma, M., Blazar, B. R., Mellor, A. L., et Munn, D. H. (2007b).

- Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest* 117, 2570-2582.
- Sharma, M. D., Hou, D., Liu, Y., Koni, P. A., Metz, R., Chandler, P., Mellor, A. L., He, Y., et Munn, D. H. (2009). Indoleamine 2,3-dioxygenase controls conversion of Foxp3+ Tregs to TH17-like cells in tumor-draining lymph nodes. *Blood* 113, 6102-6111.
- Sharpe, A. H., et Freeman, G. J. (2002). The B7-CD28 superfamily. *Nat. Rev. Immunol* 2, 116-126.
- Shigematsu, H., Reizis, B., Iwasaki, H., Mizuno, S., Hu, D., Traver, D., Leder, P., Sakaguchi, N., et Akashi, K. (2004a). Plasmacytoid dendritic cells activate lymphoid-specific genetic programs irrespective of their cellular origin. *Immunity* 21, 43-53.
- Shigematsu, H., Reizis, B., Iwasaki, H., Mizuno, S., Hu, D., Traver, D., Leder, P., Sakaguchi, N., et Akashi, K. (2004b). Plasmacytoid dendritic cells activate lymphoid-specific genetic programs irrespective of their cellular origin. *Immunity* 21, 43-53.
- Shortman, K., et Liu, Y. J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2, 151-61.
- Siegal, F. P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P. A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., et Liu, Y. J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284, 1835-1837.
- Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M. S., Lüthy, R., Nguyen, H. Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., et al. (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89, 309-319.
- Soumelis, V., et Liu, Y. (2006). From plasmacytoid to dendritic cell: morphological and functional switches during plasmacytoid pre-dendritic cell differentiation. *Eur. J. Immunol* 36, 2286-2292.
- Soumelis, V., Scott, I., Gheyas, F., Bouhour, D., Cozon, G., Cotte, L., Huang, L., Levy, J. A., et Liu, Y. J. (2001). Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood* 98, 906-912.
- Spits, H., Couwenberg, F., Bakker, A. Q., Weijer, K., et Uittenbogaart, C. H. (2000). Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2. *J. Exp. Med* 192, 1775-1784.
- Stahl, P. D. (1990). The macrophage mannose receptor: current status. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* 2, 317-318.
- Stary, G., Bangert, C., Tauber, M., Strohal, R., Kopp, T., et Stingl, G. (2007). Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *J. Exp. Med* 204, 1441-1451.
- Stary, G., Klein, I., Kohlhofer, S., Koszik, F., Scherzer, T., Müllauer, L., Quendler, H., Kohrgruber, N., et Stingl, G. (2009). Plasmacytoid dendritic cells express TRAIL and induce CD4+ T-cell apoptosis in HIV-1 viremic patients. *Blood* 114,

- 3854-3863.
- Steinman, R. M., et Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med* *137*, 1142-1162.
- Steinman, R. M., et Witmer, M. D. (1978). Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *75*, 5132-5136.
- Steinman, R. M., et Nussenzweig, M. C. (2002). Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *99*, 351-358.
- Stent, G., Reece, J. C., Baylis, D. C., Ivinson, K., Paukovics, G., Thomson, M., et Cameron, P. U. (2002). Heterogeneity of freshly isolated human tonsil dendritic cells demonstrated by intracellular markers, phagocytosis, and membrane dye transfer. *Cytometry* *48*, 167-176.
- Stoitzner, P., Tripp, C. H., Eberhart, A., Price, K. M., Jung, J. Y., Bursch, L., Ronchese, F., et Romani, N. (2006). Langerhans cells cross-present antigen derived from skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *103*, 7783-7788.
- Suzuki, J., Ikeda, T., Kuroyama, H., Seki, S., Kasai, M., Utsuyama, M., Tatsumi, M., Uematsu, H., et Hirokawa, K. (2004). Regulation of osteoclastogenesis by three human RANKL isoforms expressed in NIH3T3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun* *314*, 1021-1027.
- Svensson, M., Stockinger, B., et Wick, M. J. (1997). Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells. *J. Immunol* *158*, 4229-4236.
- Taichman, R. S., et Emerson, S. G. (1994). Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. *J. Exp. Med* *179*, 1677-1682.
- Taylor, P., Tamura, T., Kong, H. J., Kubota, T., Kubota, M., Borghi, P., Gabriele, L., et Ozato, K. (2007). The feedback phase of type I interferon induction in dendritic cells requires interferon regulatory factor 8. *Immunity* *27*, 228-239.
- Takahashi, N., Akatsu, T., Udagawa, N., Sasaki, T., Yamaguchi, A., Moseley, J. M., Martin, T. J., et Suda, T. (1988). Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* *123*, 2600-2602.
- Takai, H., Kanematsu, M., Yano, K., Tsuda, E., Higashio, K., Ikeda, K., Watanabe, K., et Yamada, Y. (1998). Transforming growth factor-beta stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *J. Biol. Chem* *273*, 27091-27096.
- Takayanagi, H. (2007). Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat. Rev. Immunol* *7*, 292-304.
- Takeda, K., et Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol* *17*, 1-14.

- Taniguchi, T., et Takaoka, A. (2002). The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Curr. Opin. Immunol* *14*, 111-116.
- Taub, D. D., Conlon, K., Lloyd, A. R., Oppenheim, J. J., et Kelvin, D. J. (1993). Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science* *260*, 355-358.
- Taylor, M. E., Conary, J. T., Lennartz, M. R., Stahl, P. D., et Drickamer, K. (1990). Primary structure of the mannose receptor contains multiple motifs resembling carbohydrate-recognition domains. *J. Biol. Chem* *265*, 12156-12162.
- Tel, J., Lambeck, A. J. A., Cruz, L. J., Tacke, P. J., de Vries, I. J. M., et Figdor, C. G. (2010). Human plasmacytoid dendritic cells phagocytose, process, and present exogenous particulate antigen. *J. Immunol* *184*, 4276-4283.
- Terpos, E., et Dimopoulos, M. (2005). Myeloma bone disease: pathophysiology and management. *Ann. Oncol* *16*, 1223-1231.
- Théry, C., et Amigorena, S. (2001). The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol* *13*, 45-51.
- Tian, J., Avalos, A. M., Mao, S., Chen, B., Senthil, K., Wu, H., Parroche, P., Drabic, S., Golenbock, D., Sirois, C., et al. (2007). Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat. Immunol* *8*, 487-496.
- Tough, D. F., Borrow, P., et Sprent, J. (1996). Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo. *Science* *272*, 1947-1950.
- Treilleux, I., Blay, J., Bendriss-Vermare, N., Ray-Coquard, I., Bachelot, T., Guastalla, J., Bremond, A., Goddard, S., Pin, J., Barthelemy-Dubois, C., et al. (2004). Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin. Cancer Res* *10*, 7466-7474.
- Trinchieri, G., Santoli, D., Dee, R. R., et Knowles, B. B. (1978). Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Identification of the anti-viral activity as interferon and characterization of the human effector lymphocyte subpopulation. *J. Exp. Med* *147*, 1299-1313.
- Trinite, B., Voisine, C., Yagita, H., et Josien, R. (2000). A subset of cytolytic dendritic cells in rat. *J. Immunol* *165*, 4202-8.
- Tsukii, K., Shima, N., Mochizuki, S., Yamaguchi, K., Kinoshita, M., Yano, K., Shibata, O., Udagawa, N., Yasuda, H., Suda, T., et al. (1998). Osteoclast differentiation factor mediates an essential signal for bone resorption induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3, prostaglandin E2, or parathyroid hormone in the microenvironment of bone. *Biochem. Biophys. Res. Commun* *246*, 337-341.
- Udagawa, N., Takahashi, N., Jimi, E., Matsuzaki, K., Tsurukai, T., Itoh, K., Nakagawa, N., Yasuda, H., Goto, M., Tsuda, E., et al. (1999). Osteoblasts/stromal cells stimulate

- osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor: receptor activator of NF-kappa B ligand. *Bone* 25, 517-523.
- Urosevic, M., Dummer, R., Conrad, C., Beyeler, M., Laine, E., Burg, G., et Gilliet, M. (2005). Disease-independent skin recruitment and activation of plasmacytoid dendritic cells following imiquimod treatment. *J. Natl. Cancer Inst* 97, 1143-1153.
- Usui, M., Xing, L., Drissi, H., Zuscik, M., O'Keefe, R., Chen, D., et Boyce, B. F. (2008). Murine and chicken chondrocytes regulate osteoclastogenesis by producing RANKL in response to BMP2. *J. Bone Miner. Res* 23, 314-325.
- Valladeau, J., Ravel, O., Dezutter-Dambuyant, C., Moore, K., Kleijmeer, M., Liu, Y., Duvert-Frances, V., Vincent, C., Schmitt, D., Davoust, J., et al. (2000a). Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 12, 71-81.
- Valladeau, J., Ravel, O., Dezutter-Dambuyant, C., Moore, K., Kleijmeer, M., Liu, Y., Duvert-Frances, V., Vincent, C., Schmitt, D., Davoust, J., et al. (2000b). Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 12, 71-81.
- Vanbervliet, B., Bendriss-Vermare, N., Massacrier, C., Homey, B., de Bouteiller, O., Brière, F., Trinchieri, G., et Caux, C. (2003). The inducible CXCR3 ligands control plasmacytoid dendritic cell responsiveness to the constitutive chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)/CXCL12. *J. Exp. Med* 198, 823-830.
- Varol, C., Vallon-Eberhard, A., Elinav, E., Aychek, T., Shapira, Y., Luche, H., Fehling, H. J., Hardt, W., Shakhar, G., et Jung, S. (2009). Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity* 31, 502-512.
- Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C., et Stockinger, B. (2008). Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat. Immunol* 9, 1341-1346.
- Vercoulen, Y., Wehrens, E. J., van Teijlingen, N. H., de Jager, W., Beekman, J. M., et Prakken, B. J. (2009). Human regulatory T cell suppressive function is independent of apoptosis induction in activated effector T cells. *PLoS ONE* 4, e7183.
- Vermi, W., Riboldi, E., Wittamer, V., Gentili, F., Luini, W., Marrelli, S., Vecchi, A., Franssen, J., Communi, D., Massardi, L., et al. (2005). Role of ChemR23 in directing the migration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to lymphoid organs and inflamed skin. *J. Exp. Med* 201, 509-515.
- Villadangos, J. A., et Shortman, K. (2010). Found in translation: the human equivalent of mouse CD8+ dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*. Available at:

- <http://www.jem.org.gate2.inist.fr/cgi/doi/10.1084/jem.20100985>  
[Accédé Juin 1, 2010].
- 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.
- 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.
- Vollenweider, R., et Lennert, K. (1983). Plasmacytoid T-cell clusters in non-specific lymphadenitis. *Virchows Arch., B, Cell Pathol* 44, 1-14.
- 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.
- de Vries, H. J. C., Teunissen, M. B. M., Zorgdrager, F., Picavet, D., et Cornelissen, M. (2007). Lichen planus remission is associated with a decrease of human herpes virus type 7 protein expression in plasmacytoid dendritic cells. *Arch. Dermatol. Res* 299, 213-219.
- 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.
- Walunas, T. L., Bakker, C. Y., et Bluestone, J. A. (1996). CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J. Exp. Med* 183, 2541-2550.
- Wang, H., Peters, N., et Schwarze, J. (2006). Plasmacytoid dendritic cells limit viral replication, pulmonary inflammation, and airway hyperresponsiveness in respiratory syncytial virus infection. *J. Immunol* 177, 6263-6270.
- 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, S. J., Wreesmann, V. B., et Bourguignon, L. Y. W. (2007). Association of CD44 V3-containing isoforms with tumor cell growth, migration, matrix metalloproteinase expression, and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Head Neck* 29, 550-558.
- Wang, Y., Ito, T., Wang, Y., Homey, B., Watanabe, N., Martin, R., Barnes, C. J., McIntyre, B. W., Gilliet, M., Kumar, R., et al. (2006). Maintenance and polarization of human TH2 central memory T cells by thymic stromal lymphopoietin-activated dendritic cells. *Immunity* 24, 827-838.
- Watts, C. (2004). The exogenous pathway for antigen presentation on major histocompatibility complex class II and CD1 molecules. *Nat. Immunol* 5, 685-692.
- Watts, T. H. (2005). TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu. Rev. Immunol* 23, 23-68.

- Wei, S., Kryczek, I., Zou, L., Daniel, B., Cheng, P., Mottram, P., Curiel, T., Lange, A., et Zou, W. (2005). Plasmacytoid dendritic cells induce CD8<sup>+</sup> regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* 65, 5020-5026.
- Wendland, M., Czeloth, N., Mach, N., Malissen, B., Kremmer, E., Pabst, O., et Förster, R. (2007). CCR9 is a homing receptor for plasmacytoid dendritic cells to the small intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 104, 6347-6352.
- Whitford, K. L., Marillat, V., Stein, E., Goodman, C. S., Tessier-Lavigne, M., Chédotal, A., et Ghosh, A. (2002). Regulation of cortical dendrite development by Slit-Robo interactions. *Neuron* 33, 47-61.
- Wilson, N. S., et Villadangos, J. A. (2004). Lymphoid organ dendritic cells: beyond the Langerhans cells paradigm. *Immunol. Cell Biol* 82, 91-98.
- 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.
- Wittamer, V., Bondue, B., Guillabert, A., Vassart, G., Parmentier, M., et Communi, D. (2005). Neutrophil-mediated maturation of chemerin: a link between innate and adaptive immunity. *J. Immunol* 175, 487-493.
- Wojtuszczyzn, A., Andres, A., Morel, P., Charvier, S., Armanet, M., Toso, C., Choi, Y., Bosco, D., et Berney, T. (2009). Immunomodulation by blockade of the TRANCE co-stimulatory pathway in murine allogeneic islet transplantation. *Transpl. Int* 22, 931-939.
- Wolf, A. I., Buehler, D., Hensley, S. E., Cavanagh, L. L., Wherry, E. J., Kastner, P., Chan, S., et Weninger, W. (2009). Plasmacytoid dendritic cells are dispensable during primary influenza virus infection. *J. Immunol* 182, 871-879.
- Woltman, A. M., de Fijter, J. W., Zuidwijk, K., Vlug, A. G., Bajema, I. M., van der Kooij, S. W., van Ham, V., et van Kooten, C. (2007). Quantification of dendritic cell subsets in human renal tissue under normal and pathological conditions. *Kidney Int* 71, 1001-1008.
- Wong, B. R., Josien, R., Lee, S. Y., Sauter, B., Li, H. L., Steinman, R. M., et Choi, Y. (1997a). TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J Exp Med* 186, 2075-80.
- Wong, B. R., Rho, J., Arron, J., Robinson, E., Orlinick, J., Chao, M., Kalachikov, S., Cayani, E., Bartlett, F. S., Frankel, W. N., et al. (1997b). TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem* 272, 25190-4.
- Xing, L., Schwarz, E. M., et Boyce, B. F. (2005). Osteoclast precursors, RANKL/RANK, and immunology. *Immunol. Rev* 208, 19-29.
- Xu, H., Dawson, R., Forrester, J. V., et Liversidge, J. (2007). Identification of novel dendritic cell populations

- in normal mouse retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 48, 1701-1710.
- Yang, G., Lian, Z., Kikuchi, K., Liu, Y., Ansari, A. A., Ikehara, S., et Gershwin, M. E. (2005). CD4-plasmacytoid dendritic cells (pDCs) migrate in lymph nodes by CpG inoculation and represent a potent functional subset of pDCs. *J. Immunol* 174, 3197-3203.
- 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.
- Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., et al. (1998). Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3597-602.
- Yoneyama, H., Matsuno, K., Toda, E., Nishiwaki, T., Matsuo, N., Nakano, A., Narumi, S., Lu, B., Gerard, C., Ishikawa, S., et al. (2005). Plasmacytoid DCs help lymph node DCs to induce anti-HSV CTLs. *J. Exp. Med* 202, 425-435.
- 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.
- Yoshida, H., Naito, A., Inoue, J., Satoh, M., Santee-Cooper, S. M., Ware, C. F., Togawa, A., Nishikawa, S., et Nishikawa, S. (2002). Different cytokines induce surface lymphotoxin-alpha on IL-7 receptor-alpha cells that differentially engender lymph nodes and Peyer's patches. *Immunity* 17, 823-833.
- Yun, T. J., Chaudhary, P. M., Shu, G. L., Frazer, J. K., Ewings, M. K., Schwartz, S. M., Pascual, V., Hood, L. E., et Clark, E. A. (1998). OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40. *J. Immunol* 161, 6113-6121.
- Zabel, B. A., Silverio, A. M., et Butcher, E. C. (2005). Chemokine-like receptor 1 expression and chemerin-directed chemotaxis distinguish plasmacytoid from myeloid dendritic cells in human blood. *J. Immunol* 174, 244-251.
- 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, J., Raper, A., Sugita, N., Hingorani, R., Salio, M., Palmowski, M. J., Cerundolo, V., et Crocker, P. R. (2006). Characterization of Siglec-H as a novel endocytic receptor expressed on murine plasmacytoid dendritic cell precursors. *Blood* 107, 3600-3608.
- Zhu, J., et Paul, W. E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112, 1557-1569.

Zou, W., Machelon, V., Coulomb-L'Hermin, A., Borvak, J., Nome, F., Isaeva, T., Wei, S., Krzysiek, R., Durand-Gasselín, I., Gordon, A., et al. (2001). Stromal-derived factor-1

in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat. Med* 7, 1339-1346.

## Spécialisation fonctionnelle des sous-populations de cellules dendritiques plasmacytoïdes

La génération d'un anticorps monoclonal spécifique des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) splénique du rat, nommé 85C7, par notre équipe a permis la mise en évidence d'une population de cellules exprimant le 85C7 mais n'exprimant que faiblement le CD4. Les pDC classiquement décrites chez le rat sont quant à elles fortement CD4. On a donc voulu caractériser cette population pour savoir s'il s'agissait de pDC. Leur phénotype s'est révélé être assez similaire tout comme leur morphologie plasmacytoïde à l'état immature. En réponse à un ligand de TLR9, cette population exprime fortement l'ARNm codant l'IFN $\alpha$ , ce qui est la caractéristique principale des pDC. Ces cellules ont également une capacité à faire proliférer des lymphocytes T (LT) CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> naïfs deux fois plus importante que les pDC CD4<sup>+</sup>. Tout ceci suggère que ces cellules sont des pDC. La compilation de puces à ADN réalisées à partir des deux populations de pDC avec d'autres puces à ADN réalisées sur les DC conventionnelles spléniques a permis d'identifier certains gènes d'intérêt spécifiquement exprimés par l'une des populations de pDC. De manière surprenante, il est ressorti le gène codant la protéine TRANCE (TNF-related activation-induced cytokine) spécifiquement et constitutivement exprimé par les pDC CD4<sup>high</sup>. L'expression de la protéine a été confirmée sous forme membranaire et soluble. Cette protéine étant connue pour son rôle indispensable dans l'ostéoclastogénèse, nous avons donc testé le pouvoir potentiel des pDC à induire une ostéoclastogénèse dans différents modèles.

Mots clés : Rat, TRANCE, cellules dendritiques

## Functional specialization of rat plasmacytoid dendritic cells subsets

The generation of a rat splenic plasmacytoid dendritic cells (pDC) monoclonal antibody, named 85C7, in our team allowed the identification of a population expressing 85C7 but a low level of CD4. pDC usually described in rat highly express CD4. So we assessed to characterize this population to discover if it was pDC. Their phenotype appeared to be very similar, as their plasmacytoid morphology at steady state. In response to TLR9 ligand, this population expresses high levels of IFN $\alpha$  mRNA, which is the main characteristic of pDC. They also have the capacity to induce naïve CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T cell proliferation, 2 fold higher than CD4<sup>high</sup> pDC. These results strongly suggest that these cells are pDC. DNA sheep results from these pDC populations taken together with results from splenic conventional DC allowed us to identify genes specifically expressed by one of these populations. Surprisingly, this analysis revealed that TRANCE (TNF-related activation-induced cytokine) gene was constitutively and specifically expressed by resting CD4<sup>high</sup> pDC. We confirmed the expression of the protein at the membrane and in a soluble form too. TRANCE is well known for its crucial role in osteoclastogenesis. We sought to assess the potential role of pDC to induce osteoclastogenesis in different models.

Keywords : Rat, TRANCE, dendritic cells