

ÉCOLE DOCTORALE SST

EA 4245, « Cellules Dendritiques et Greffes »

THÈSE présentée par :

Romain FELIX

soutenue le : 13 Décembre 2010

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie

**HOMEOSTASIE CALCIQUE AU COURS DES
EVENEMENTS PRECOCES DE LA MATURATION
DES CELLULES DENDRITIQUES HUMAINES**

THÈSE dirigée par :

Mme Florence VELGE-ROUSSEL Maître de Conférences, Université François-Rabelais de Tours
M Jean-Yves LE GUENNEC Professeur des Universités, Université Montpellier 2

RAPPORTEURS :

Mme Lucette PELLETIER Directeur de recherche INSERM, Toulouse
M Pierre LAUNAY Directeur de recherche INSERM, Paris

JURY :

M Romain GUINAMARD Professeur des Universités, Université de Caen Basse-Normandie
M Pierre LAUNAY Directeur de recherche INSERM, Paris
M Jean-Yves LE GUENNEC Professeur des Universités, Université Montpellier 2
M Yvon LEBRANCHU Professeur des Universités, Université François-Rabelais de Tours
Mme Lucette PELLETIER Directeur de recherche INSERM, Toulouse
Mme Florence VELGE-ROUSSEL Maître de Conférences, Université François-Rabelais de Tours

*“Le savant n’est pas l’homme qui fournit les vraies réponses,
c’est celui qui pose les vraies questions”*

Claude Levi-Strauss (1908-2009)

Remerciements

Tours, fin Novembre 2010

Quel difficile exercice que de synthétiser en deux ou trois pages !!! seulement les remerciements que je voudrais adresser aux différentes personnes que j'ai rencontrées et appréciées durant ma vie d'étudiant et de thésard ainsi, qu'aux personnes que je connais et qui m'entoure depuis bien plus longtemps que ça. Après avoir enfin achevé la version finale de ce manuscrit, je vais tenter de satisfaire à cet exercice de mon mieux. Toutes mes excuses aux personnes que je pourrais oublier, mes pensées vont vers vous également.

Je tiens tout d'abord à remercier le professeur Yvon LEBRANCHU. Merci pour de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans votre laboratoire ; même si le sujet était un peu exotique et éloigné de vos thématiques !!! J'espère vous avoir convaincu que les ions et les canaux sont un domaine encore peu étudié en immunologie de greffe. Merci pour remarques constructives tout au long de ses trois années.

Un merci tout particulier au docteur Florence VELGE-ROUSSEL et au professeur Jean-Yves LE GUENNEC pour avoir encadré ce travail de thèse ; mais également avoir subi mes humeurs de tous les jours !!!

Florence, je me souviens du jour où je suis venu passer mon entretien (pensez à mieux indiquer le labo pour les futurs recrutements) et vous m'avez dit que je resterai travailler au labo : quel bon souvenir, cela dit la concurrence n'était pas trop au rendez-vous... Merci pour ces trois années où vous vous êtes étoffée sur le plan de l'électrophysiologie !!!! Eh oui, au début - et je pense être dans le vrai - ce n'était pas trop difficile de me suivre ou nous suivre (avec Jean-Yves) au cours de nos nombreuses discussions, formelles ou non. Merci pour l'encadrement scientifique ou autre. En effet, ma deuxième année de thèse a été assez mouvementé sur le plan perso mais vous avez toujours été à l'écoute et de bons conseils. Et

enfin, merci pour ces années d'apprentissage de l'immunologie qui, je dois l'avouer aujourd'hui, était très floue au début et encore maintenant !!!

Jean-Yves, avant cette thèse, tu ne m'étais pas inconnu. En effet, durant mon M2R un ancien collègue de mon directeur nous avez envoyé une tête de perf pour pouvoir manipuler correctement. Eh oui, c'était toi. Quand un jour d'octobre 2007, je suis venu à Tours, pour un entretien, je n'ai pas trouvé le labo « Cellules Dendritique et Greffes » et alors je suis allé dans le bâtiment Dutrochet, au 2° étage, où tu avais ton bureau – à l'époque. Laurent m'avait dit : « T'inquiètes, tu vas le reconnaître. C'est une personne avec des lunettes – OK – et une barbe – là problème !!!! Mais, une charmante personne m'a emmené à ton bureau, Cathy Cat... Eh oui, merci Jean-Yves pour ces trois années même si sur la fin tu n'étais pas sur Tours. Merci, pour les congrès à Fontevraud et tous les services perso... Et comme dirait un grand philosophe : « Après quelques verres, l'intelligence est au rendez-vous » !!! T'inquiètes, les verres, il y en aura après la soutenance !!!! Enfin, merci pour le séjour montpelliérain du mois de mai 2010, une mention spéciale pour ton accueil chaleureux dans ta « villa » du Sud de la France !!! Merci et j'espère que nos routes se croiseront de nouveau...

Je voudrais exprimer mes plus sincères remerciements aux membres de mon jury. Merci à Mme Lucette PELLETIER et M. Pierre LAUNAY qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de ce travail, malgré leurs nombreuses charges. Merci également à Monsieur Romain GUINAMARD, le caennais d'adoption, d'avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examineur.

J'adresse mes plus grands remerciements à tous les membres du laboratoire Cellules Dendritiques et Greffes. Merci à vous pour votre accueil, vos conseils, et tous les bons moments passés en votre compagnie. Merci à vous tous pour l'excellente ambiance de travail qui règne au sein de ce laboratoire et qui fait que chaque jour, c'est une joie d'aller au boulot.

Merci, à nos secrétaires, successives, pour leur bonne humeur et leur efficacité dans le passage des commandes – eh oui SIFAC, ce n'est pas la joie.

Une pensée émue à tous mes co-thésards (passés ou présents) qui ont partagé une partie de cette thèse à mes côtés :

- Roxane, merci pour ces moments de rigolade dans le bureau 2 et pour tous tes conseils très précieux sur les techniques d'immuno (anneau, FACS, ELISA...). Merci pour tout !!!!

- Laurence, merci pour cette petite année passée à tes côtés avec ce bel accent toulousain !!!

- Caro, la sportive du labo, merci pour cette bonne humeur qui te caractérisait tant mais également pour ces soirées improvisées (match de hand et découverte de spécialité canadienne. J'espère que nos chemins se croiseront un jour !!!

- Audrey, merci pour ton accent du Sud qui fait que tu ne peux renier tes origines – et je pense que tu ne veux pas le faire !!! Merci, pour les produits typiques de ta région : aligot, prunes mais aussi pour les économies sur les produits laitiers (merci Julien)... Partir de chez vous était toujours une prise de tête pour savoir qui conduirait au retour !!!

- Florence H, la spécialiste de l'IL-2 que j'essaie de convertir au Calcium... Vivement la suite des manip avec la TG et tous les CD des lympho T !!! Merci, pour tout au boulot mais aussi au sein de l'ADOCT !!!

- Catherine, l'enfant du labo. Continue à être comme tu es et ne change rien à part peut-être l'affiche derrière toi, ça ne fait pas très sérieux !!! Et t'inquiètes le monde des canaux, ce n'est pas si compliqué que l'on peut croire : vive P2X7 !!!

Merci, à toutes nos techniciennes de choc :

- Daniëlle, la « disséqueuse » de chien qui s'est vite mis à la culture cellulaire et qui gère d'une main de maître les stocks du labo... T'inquiètes, il y a des filles qui arrivent pour t'aider !!!!

- Audrey D, la joie de vivre du labo. Le temps passé à travailler avec toi a été trop court à mon goût, je pense que l'on aurait pu se marrer quelque fois !!!

- Bertille, la petite « jeune », merci pour les manip et pour ta gentillesse et ta bonne humeur. Bon courage pour ton nouveau travail et à bientôt je l'espère.

- Roseline et Isabelle, les petites nouvelles. Pas facile d'écrire quelque chose ; mais bon courage à vous deux et si besoin, je serai là pour vous répondre...

Un très grand MERCI à Sylvie, la technicienne de rêve. Merci pour toutes les marquages et les Si, en doublette avec la fluo !!! Dommage que tu sois parti si vite et que tu ne vois pas les finalités de ce sujet. Une grande pensée pour toi...

Christophe, merci pour tes conseils au quotidien et j'espère t'avoir convaincu que les canaux peuvent servir en immuno !!!

Merci, aux membres du service de néphro : Matthias, Jean-Michel, Mr Nivet...

Merci, aux M2 successifs du labo :

- Philippe, merci pour tes cafés de médecin !!! Et pour tes éclairages en réunion sur des études de recherche clinique...

- Fabien, le décalé de service. Merci pour ces soirées improvisées et pour l'apprentissage de musique « douce » (Tool...)

- Aurélie, la M1 qui voulait faire un arc-en-ciel avec un ELISA et ensuite la M2R, spécialiste du PRR et des Ig de lapin. Merci pour ta bonne humeur et pour m'avoir supporté durant tes journées d'apprentissage de la recherche... Bon courage pour supporter Flo durant ce stage...

- Hélène, la caennaise exilée en Touraine. Merci, pour ta bonne humeur et pour m'avoir fait penser à ma Normandie natale quand je te voyais. Bon courage pour la fin de thèse de Médecine...

- David, le « patcheur fou ». Mon M2R de 2010, merci pour ces 6 mois de manip sur la signature potassique des DC. Eh oui, j'ai réussi à convertir un immunologiste en électrophysiologiste. Bon courage dans ton pays ensoleillé et pense à nous en envoyé... On se donne rdv en congrès d'électrophy pour boire oups pour bosser !!!

- Florence U, « la pédiatre à la bière ». Merci pour ces soirées arrosées, pour ta belle robe bleue et ta jolie coiffure du 17 juillet 2010. Bisous et attention à l'alcool, c'est dangereux pour les Trolls (???)...

Eh non, ce n'est pas fini !!! C'est ça quand on bosse sur 2 labos... Donc un grand merci aux membres du N2C (Nutrition, Croissance et Cancer)...

Merci au professeur Philippe BOUGNOUX de m'avoir permis d'utiliser le matériel de son laboratoire pour mener à bien ce travail. Et merci pour ces cours d'œnologie d'un soir de novembre 2010...

Merci à la plus cool des secrétaires : « Cathy Cat ». Merci pour ces midi à découvrir tes repas sans viande, mais tu n'arriveras pas à me convertir. C'est trop bon la viande !!!

Merci « ZaZa », Isabelle, la technicienne espagnole !!! Eh, Dame DOMINGO, ça y est je ne t'embêterai plus avec cette fameuse paëlla ; mais voici mon numéro (06 71 95 55 55) si tu changes d'avis !!! Merci également à Amandine, la petite jeune du squad des techniciennes, et désolé mais tu avais de jolis sous-vêtements !!! Ceux qui y étaient vont comprendre...

Merci à Caro et Mimsy pour leur compréhension des discussions du midi. Eh oui les filles, il faut écouter !!!

Merci à l'équipe Nutrition (Stéphane, Jean-François et Mimsy), pour cette bonne odeur de viande du matin. Elle est un peu tenace !!!

Merci Karine, pour ta bonne humeur. Et fait attention à ce que tu manges le midi, la dénutrition ça arrive vite !!!

Merci à Jacques pour sa bonne humeur et sa culture musicale, que l'on peut mesurer à chaque repas de Noël. Bon courage avec La petite Lucie.

Merci à Stéphane C pour son humour grinçant (Le tuyau d'arrosage ???) et pour la théorie de l'intelligence...

Merci Aurélie, dit ORL ou Mamie pour tes conseils en immuno, eh oui tu es issue de la même spécialité que moi !!! Fais attention à toi et au mini-Jéjé ou mini-ORL !!! Je te préparerai un plat spécial pour le jour de l'an...

Merci Christophe de nous faire toujours rire !!! Merci à toi pour les nombreuses discussions scientifiques que l'on a pu avoir ensemble au laboratoire et les théories plus ou moins loufoques que l'on a pu élaborer. Sinon, c'est l'histoire d'un « chat qui a mal à la

gorge. Il va à la pharmacie et ... » A toi de deviner la suite, ça ne devrait pas être trop dur !!! Si je rachète la compagnie CARAMBAR, je te fais signe pour les blagues !!! Bon courage, pour la suite, le prochain étudiant c'est le tien... PS : J'attends toujours une bière et une bouteille de cognac. Affaire à suivre...

Merci à Seb, dit « Cousin ». Eh oui, à l'été 2008, nous nous sommes découvert un lien de parenté (très éloigné voire non existant) mais bon ce surnom nous est resté. Merci pour tes conseils précieux en électrophys et pur ta bonne humeur. Bon, ton humour se situe un peu au-dessus du genou, mais on fait avec... Enfin, si tu as encore un problème avec tes égouts, je connais un bon avocat !!! PS : Evites de manger indien la veille de ma thèse, ça m'arrangerait !!!

Merci à Dame POTIER, mon témoin de substitution. Merci, pour ces années de franche rigolade et de bonheur. Je croise les doigts pour toi et sache que ma porte sera toujours ouverte pour un bon petit plat plein d'oignons et de crème, après un bon footing estival. Si ton homme ne veut pas courir, il boira une bière avec moi !!! RDV en juin, j'ai une petite vengeance à prendre...

Et un grand MERCI à tous les étudiants passés et présents de ce labo :

Sophie K, même si ta petite absence d'une année fut rapide, Merci pour les midis de bonne humeur passés à tes côtés...

Alban, mon prof de fluo. Merci pour l'apprentissage de la fluo et pour les franches rigolades de congrès et autres !!! Et, surtout, souviens-toi bien que les matures sont les plus poilues !!! Et ça tu peux également le vérifier dans la vie de tous les jours... Attention, sois patient ton tour viendra assez vite comme ça... Tu me tiendras au courant !!!

Lucie B, dit « Mini Moy ». Merci pour ces congrès (Canaux Ioniques, par ex) mais aussi attention de ne pas prendre le melon avec ta publi dans Oncogene !!! Bon courage, pour la suite et bon voyage en Italie... Penses à nous ramener des spécialités de là-bas : mais pas un fabio...

Fabio, le rital de service. Merci pour cette patience qui te caractérise tant et désolé d'être notre souffre-douleur du labo mais c'est tellement bon !!! Souviens-toi, la plage à Giens, c'est celle sur la gauche !!! Tu trouveras...

Johan, dit « Champion », mon collègue de patch sur cellules myéloïdes. Merci, pour toutes ces KG-1 et THP-1 que tu m'as gentilleme nt donné !!! Et pour les figures de rampe aussi, mai chut faut pas 'ébruité !!! Bon courage pour la suite et STP remets-toi à l'électrophy, c'est toi qui doit driver ton sujet mais aussi c'est un monde tellement beau...

Ludovic, dit Ludo, mon alcoolique, oups mon acolyte de congrès !!! Merci pour ces partages de chambres, ces réflexions sur le paysage durant les voyages, ces repas arrosés et la découverte du monde la faluche tourangeau !!! Quand je dis fluche, c'est bien sûr la découverte des bars de la ville. Si tu n'as toujours rien trouvé dans qq mois, on va postuler chez Hamamatsu, vu le maître en blague que l'on connaît !!! Encore, merci pour tout, bon vent l'ami...

Les petits derniers : Billel, Ramez et Virginie. Merci pour votre bonne humeur et faites attention je ne serai plus là pour vous sauvez la vie en vous dépannant d'un produit quelconque... Organisés vos commandes et soyez gentils avec Cathy Cat, sinon pas de commandes et pas de produits...

Lucie C, dit « Boulette ». Merci Monsieur-Madame (pardon), pour ta bonne humeur et pour ta vitesse d'élocution !!! Merci pour tout et bon courage pour la suite, on se fera un petit resto de temps en temps pour se donner des news !!! N'hésites pas à appeler si tu veux des conseils...

Merci aux anciens du N2C, que je ne connais que par les soirées :

Emeline, la technicienne. Quand tu veux, on se refait une descente de canoë sur la Vienne. Mais la prochaine fois, on fait la grande descente et sans Pierre et Cathy Cat !!! Bon courage pour la suite...

Aurélia, dit « Auré ». Merci pour ces soirées BBQ à l'éventail chinois !!! Et peut-être à bientôt dans le train, si je trouve un post-doc sur Paris... On se tient au courant et bises à Bichon !!!

Tran. Merci pour tous les conseils et ton expérience de la bricole dans le labo !!! Bon courage pour la suite et bises à la famille...

Aude, la montpelliéraine. Merci, pour ta bonne humeur, ta gentillesse et ces congrès partagés à tes côtés. Et surtout désolé pour ton pantalon !!!! (Tu devrais comprendre...) Bon courage pour la suite et tiens au courant quand tu repasses en Touraine...

Une pensée particulière pour Laurent SALLÉ (t'as vu, j'ai mis l'accent !!!), mon directeur de M2R. Merci Laurent, pour tes précieux conseils et pour la formation sur le tas que tu m'as donné pendant les deux années de travail ensemble (on en a connu des emmerdes !!!). Merci pour l'appui pour l'obtention de la bourse de thèse mais j'aurai préféré continué à tes côtés !!! Merci pour ces pots au Stop Bar et ces repas au labo !!! J'espère que nos routes se recroiseront un jour !!! MERCI pour tout...

Merci à J-B, mon pote militaire. Reviens vite d'Afga pour que l'on puisse arroser ça. Bon courage et à bientôt...

Merci à Fabrice et Annie, du Sham. Ne vous inquiétez pas, je reste en Touraine, donc encore de folles soirées dans votre superbe établissement : humour, bonne bière et saucisson sont toujours au rendez-vous !!!

Après les labos, place aux potes du Rugby (faut dire qu'il y en a pas mal !!!):

MERCI, à tous les ex- et joueurs actuels du CNRC :

- Loulou et Lulu, merci pour votre soutien sans faille. Promis, quand on rentre on se fait une bouffe !!! Bisous à Lily...

- La famille MARIE : merci Céline pour avoir attendue !!! Bon courage à vous pour la suite et à bientôt...

- Nico, dit « mobylette », merci pour l'hébergement après quelques soirées arrosées en célibataire (en tout cas pour ma part). Et faudra passer un we en Touraine, y'a des bars aussi !!! Bisous

- La famille L'ÉLOGEAIS. Sandrine et Eric, les voisins des beaux-parents !!!
Heureusement que vous n'habitez pas trop loin !!! Merci pour ces soirées improvisées quand
il le fallait !!! A bientôt...

- Laurent, dit Lolo. Merci pour ces prêts de véhicules et pour ton soutien !!!
Bonjour à Sylvie, à bientôt...

- Benjamin, dit « Ben », merci pour tous les coups de main (pro ou perso) au
cours de ces belles années de fac !!! Merci pour ton amitié et bonjour à Stéph...

- La famille ROYER, merci pour votre bonne humeur et pour ces soirées de
ouf !!! Merci et à bientôt, quand vous passez dans la région appelez !!!

MERCI à tous les autres que j'aurai pu oublier : la Viv, Stéph R, Sylvain, Dom,
Doudou, Alain et Monique, Fab, Bricolle et Soline, Vévé et Cat, Yan (le docteur ès sciences),
Alex, Jérém, Q et Nadège, Antoine, François dit le Tortionnaire et Marie-Claude, Annabelle,
Patrice et Sophie, Manau et Claire, François et Véronique... Désolé si j'en ai oublié !!!

Merci au XV Luinois, pour m'avoir accueilli à bras ouvert pour cette nouvelle
aventure rugbystique en Touraine. Merci aux coachs pour leur compréhension de mes
absences au club !!!

C'est maintenant au tour de la famille :

Maman, merci de m'avoir permis de mener à bien mes études... J'espère que tu es
fière de ta progéniture !!!

Mamina, ma grand-mère. Merci pour les ravitaillements d'un régiment à chaque fois
que l'on rentre à Bellou... Merci pour les dessous de table !!! Maintenant, on aura peut-être
un peu plus de temps à t'accorder...

La famille LADROUË : Les gars, Tonton Martial et Véro. Merci pour votre soutien
sans faille et pour tout !!! Véro, ma grande sœur. Merci pour la complicité de toujours et
pour tout ce que tu as fait pour moi et maintenant pour nous. Je ne serai jamais assez
reconnaisant...

La belle famille. Merci à tous pour votre soutien et pour les bons moments passés ensemble. Maintenant, je n'aurai pas la tête dans les études !!! On va arroser ça, il paraît qu'il reste des bulles de cet été...

Brigitte et Dominique (les beaux-parents), dit « Belle maman » et « Domingo » ou « joli papa ». Merci pour tous les sacrifices que vous avez fait et pour le soutien quand ça n'allait pas trop !!! Désolé pour le trou dans le mur mais fallait bien accrocher le nouveau tableau !!!

Merci à Guillaume, le toulousain, mon beauf. Merci pour cet hébergement de fortune à l'aube d'un super congrès (hein Ludo !!!). Merci pour ton humour, pour tes expressions toujours inoubliables (Kiker des meufs !!!). Fais attention à toi et ta moitié. Vivement les fêtes pour boire un coup avec tout le monde...

J'ai gardé le meilleur pour la fin. MERCI à toi, mon amour !!! Merci pour tout ce que tu m'apportes depuis toutes ces années. Tu as accepté de venir en Touraine car j'y étais depuis un an, déjà. C'est une belle preuve d'amour. Merci pour le soutien et pour ce que tu es tout simplement... Tu me diras si je me trompe mais je crois que 2010 est une très bonne année, pour nous. Après un magnifique mariage et la fin de tes études, je m'appête à terminer les miennes. Désolé pour les sautes d'humeur, durant la période de rédaction et de l'oral... Tout simplement, merci pour tout et je t'aime !!! Et enfin, MERCI pour la suite, j'espère que la vie nous apportera tout ce que l'on désire ; que nous ne manquerons pas nos actes...

MERCI à tous pour les bons moments et le soutien !!!

Romain

Résumé

En transplantation d'organes, la réponse immunitaire de l'hôte contre son donneur reste une cause très importante de perte de greffons. Ainsi, un meilleur contrôle de la réponse allogénique par induction d'une tolérance spécifique reste l'une des priorités en transplantation humaine. Les cellules dendritiques (DC) humaines ont un rôle majeur dans le déclenchement de la réponse allogénique. Ainsi une meilleure connaissance de la physiologie ionique des DC humaines peut avoir des conséquences thérapeutiques en transplantation. L'implication des ions, en particulier du calcium et du potassium, dans la physiologie des DC humaines n'est pas totalement connue.

Dans cette étude, nous avons démontré l'existence d'une ECC (Entrée Capacitive de Calcium) dans la DC humaine par des mesures de spectrofluorimétrie. Selon les agents de maturation (LPS pour Lipopolysaccharide, Zymosan or TNF- α), les ECC observées sont différentes. Dans le cas du LPS et du TNF- α , l'ECC semble comporter deux composantes : une continue insensible au 2-APB (inhibiteur connu du mécanisme SOCE) et une soutenue ou transitoire, correspondant à l'entrée proprement dite de Ca^{2+} . Cette composante est inhibée par 100 μM de 2-APB. Pour les hDC traitées par le Zymosan, l'ECC est réversible puisqu'elle disparaît lorsque l'on perfuse une solution physiologique (2mM de Ca^{2+}). Cette ECC, réversible, est sensible au 2-APB et son amplitude est diminuée d'environ 50%.

La vidange des stocks calciques obtenue par un traitement avec 750nM de Thapsigargine, est capable d'induire l'expression à la surface de marqueurs de maturation comme le CD80, CD86 et HLA-DR et fait exprimer le CD25 et le CD83 aux hDC. Cette expression de marqueurs spécifiques de la maturation des hDC semble sensible au 2-APB. En outre, les hDC vont sécréter différentes cytokines en fonction des signaux de maturation. L'inhibition de l'ECC, par le 2-APB, entraîne une diminution de la production des cytokines IL-12, IL-10 et IFN- γ . Ceci suggère que l'ECC est impliquée dans les processus de maturation et de sécrétion des cytokines des hDC.

Ces résultats nous permettent d'émettre l'hypothèse que les SOCs (Store-Operated Channels) sont impliqués dans la maturation des DC humaines. Ces SOCs ont été mis en évidence dans le lymphocyte T et le rôle de ORAI-1 et STIM-1 y est donc bien décrit. Nous avons donc étudié l'implication de ces deux protéines, dans le processus de maturation des hDC. À l'aide de si-RNA, nous avons démontré que l'inhibition de ces deux protéines (ORAI-1 et STIM-1) diminuait l'expression des marqueurs de maturation de 30%. Ceci

suggère une implication de ces deux protéines dans les évènements précoces de maturation des hDC.

Enfin, une question reste en suspend : quel est le devenir du Ca^{2+} dans la DC humaine après l'ECC? Des canaux potassiques (KCa 3.1 et KCa1.1) appartenant à des familles de canaux qui sont activés par le calcium intracellulaire et ont été mis en évidence à la surface des hDC à l'état immature et mature. Une analyse électrophysiologique de ces canaux permet de confirmer la présence de membres de ces familles sur les DC humaines. L'inhibition pharmacologique de ces canaux entraîne une diminution de l'expression de marqueurs de maturation comme le CD83 et le CD25. En effet, l'inhibition du canal KCa3.1, par le TRAM-34 (100nM), va provoquer une diminution de l'expression du marqueur de migration CCR5 sur les hDC immatures ainsi qu'une augmentation du CCR7 sur les DC matures. Cette inhibition entraîne une diminution de la capacité de migration des DC immatures alors que le TRAM-34 a tendance à augmenter la capacité de migration des DC matures. Il semble donc que le canal KCa3.1 soit impliqué dans la migration des DC immatures qui vont de la moelle vers les tissus. Ce canal contrôlerait également en partie celle des DC matures qui migrent des tissus vers les organes lymphoïdes secondaires pour initier la réponse immune. Il apparaît donc que ces canaux, plus précisément le canal KCa3.1, pourraient être une cible privilégiée de traitements contre certaines maladies immunitaires (rejet de greffe ou maladies auto-immunes).

Pour conclure, les homéostasies ioniques (Ca^{2+} et K^+) jouent un rôle important dans les propriétés des DC humaines au niveau phénotypique et fonctionnel.

Mots-clés : greffe d'organe, cellules dendritiques humaines, Calcium, Potassium, canaux capacitifs, maturation, migration, cytokines

Résumé en anglais

The immune response is a process necessary to a perfect protection of the organism. The human dendritic cells (hDC) play a key role in this process. Through their maturation by different agents, these cells are going to adapt the quality of this immune response. The implication of some ions, in particular the calcium and potassium, in the hDC physiology is not yet totally known.

In the present study, we unraveled the existence of a CCE in hDC by using fluorescence measurements of Fura-2 loaded DC, treated by Thapsigargin. Furthermore, the Ca^{2+} signal is different according to the maturing agents. For LPS and TNF- α , the Ca^{2+} entry seems to be composed of two components: a transient one matching the ER release and a sustained one corresponding to the external Ca^{2+} entry following ER depletion. We also demonstrated that the activation of CCE, *via* maturing agents, positively regulated the expression of human DC maturation markers such as CD80, CD86, and HLA-DR, and allows the expression of specific maturation markers: CD83 and CD25. Moreover, we showed that the channel ORAI-1 is responsible of this CCE, *via* the si-RNA technique. This work allowed the identification on the surface of immature and mature hDC of the potassium channels (Kca3.1, KCa1.1) belonging to families of channels that are activated by the intracellular calcium. The inhibition of these channels induced a decrease of the expression of markers of maturation as CD83 and CD25. The electrophysiological analysis of these channels confirmed the presence of members from these families on hDC. Furthermore, using specific inhibitors, we showed that the potassium through these channels plays an important role in the processes of migration of the hDC.

Thus, it appears that these ion channels, mainly the channels ORAI-1 or SK4, could be an adapted target for treatments against some immune diseases (graft rejection or auto-immune diseases).

Keywords: organ graft, human dendritic cell, Calcium, Potassium, store-operated channels, maturation, migration, cytokines

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| Remerciements..... | 3 |
| Résumé..... | 13 |
| Résumé en anglais | 15 |
| Table des matières..... | 16 |
| Liste des tableaux | 22 |
| Liste des figures | 23 |
| Liste des annexes | 26 |
| Liste des abréviations..... | 27 |
| Liste des abréviations..... | 27 |
| Introduction | 31 |
| Revue bibliographique..... | 34 |
| I. LES CELLULES DENDRITIQUES..... | 35 |
| 1. Généralités | 35 |
| 2. Ontogénie des cellules dendritiques..... | 36 |
| 3. Classification des cellules dendritiques humaines..... | 37 |
| 3.1 Les cellules dendritiques myéloïdes | 37 |
| 3.2 Les cellules dendritiques plasmacytoïdes..... | 38 |
| 3.3 Les cellules de Langerhans..... | 38 |
| 3.4 Les cellules dendritiques dermiques et interstitielles | 39 |
| 3.5 Les cellules dendritiques thymiques..... | 39 |
| 3.6 Les cellules dendritiques folliculaires | 40 |
| 3.7 Les cellules dendritiques associées aux muqueuses | 40 |
| 4. Modèles de différenciation des cellules dendritiques <i>in vitro</i> | 41 |
| 4.1 A partir de cellules souches CD34 ⁺ | 41 |
| 4.2 A partir de monocytes | 41 |
| 5. Rôle des cellules dendritiques dans l'immunité innée..... | 42 |
| 5.1 Récepteurs impliqués dans la reconnaissance des PAMP | 43 |
| 5.2 Activation par des molécules endogènes (DAMP) | 46 |
| 5.3 Activation par des cytokines inflammatoires | 47 |
| 5.4 Activation par l'engagement du CD40 | 48 |

| | |
|--|-----------|
| 5.5 Voies de signalisation impliquées dans la maturation des cellules dendritiques | 48 |
| 6. Rôle des cellules dendritiques dans l'immunité adaptative | 52 |
| 6.1 Capture des antigènes | 53 |
| 6.2 Apprêtement des antigènes | 54 |
| 6.3 Migration des cellules dendritiques | 57 |
| II. IMMUNOLOGIE DE GREFFE | 59 |
| 1. Les différentes voies d'alloreconnaissance | 61 |
| 1.1 La voie de présentation directe | 61 |
| 1.2 La voie de présentation indirecte | 63 |
| 1.3 La voie de présentation semi-directe | 64 |
| 2. Les différents types de rejet | 64 |
| 2.1 Le rejet hyperaigu | 64 |
| 2.2 Le rejet aigu | 65 |
| 2.3 Le rejet chronique | 66 |
| 3. Les immunosuppresseurs | 67 |
| 3.1 L'acide mycophénolique | 69 |
| 3.2 La rapamycine | 70 |
| 3.3 Les Glucocorticoïdes | 72 |
| 3.4 Les anti-Calcineurines | 73 |
| 3.5 L'Azathioprine | 73 |
| 3.6 Les anticorps anti-lymphocytaires | 73 |
| 4. La tolérance immune | 74 |
| 4.1 Les mécanismes généraux | 74 |
| 4.2 Les lymphocytes T régulateurs | 78 |
| 4.3 Les cellules dendritiques tolérogènes | 89 |
| III. HOMEOSTASIE CALCIQUE DES CELLULES NON-EXCITABLES : LES CELLULES IMMUNITAIRES | 93 |
| 1. Les Canaux calciques | 96 |
| 1.1 Les canaux calciques dépendants du voltage (CCVD) | 97 |
| 1.2 Les récepteurs aux dihydropyridines | 100 |
| 1.3 Le mécanisme SOCE | 104 |
| 1.4 Les canaux CRAC : le complexe ORAI/STIM/CRACR2A | 107 |
| 1.5 Les canaux TRP | 116 |

| | |
|---|------------|
| 2. Les canaux potassiques : les régulateurs de grandes fonctions cellulaires | 118 |
| 2.1 Généralités | 118 |
| 2.2 les canaux potassiques activés par le calcium intracellulaire | 121 |
| 3. Le Calcium dans les cellules immunitaires | 127 |
| 3.1 Les mastocytes..... | 127 |
| 3.2 Les neutrophiles..... | 129 |
| 3.3 Les monocytes et les macrophages..... | 130 |
| 3.4 Les lymphocytes T et B | 130 |
| 3.5 Le calcium dans l'immunodéfiance..... | 133 |
| 3.6 Les cellules dendritiques | 135 |
| IV. OBJECTIFS DE L'ETUDE | 138 |
| Matériels & Méthodes | 139 |
| I. REACTIFS | 140 |
| II. OBTENTION DES CELLULES DENDRITIQUES HUMAINES | 140 |
| 1. Différenciation des monocytes en cellules dendritiques..... | 140 |
| 2. Maturation des cellules dendritiques..... | 141 |
| III. CARACTERISATION DES CELLULES DENDRITIQUES | 141 |
| 1. Etude de l'expression des marqueurs de surface par cytométrie en flux..... | 141 |
| 2. Etude de la sécrétion de cytokines par la technique ELISA | 143 |
| IV. SPECTROFLUORIMETRIE | 143 |
| 1. Mesure de la concentration intracellulaire de Ca ²⁺ par spectrofluorimétrie avec une sonde fluorescente : le FURA-2..... | 143 |
| 2. Chargement des cellules par le FURA-2AM..... | 144 |
| 3. Solutions expérimentales | 145 |
| V. ETUDE DE LA TRANSCRIPTION DU GENE EN ARNm PAR LA TECHNIQUE DE REVERSE TRANSCRIPTION - POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR) | 146 |
| 1. Extraction et dosage des ARN cellulaires totaux..... | 146 |
| 2. Transcription inverse (Reverse Transcription : RT) | 148 |
| 3. Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction : PCR)..... | 150 |
| 4. Conception des amorces..... | 152 |
| VI. MARQUAGE POUR L'ANALYSE EN MICROSCOPIE CONFOCALE | 154 |
| VII. ELECTROPHYSIOLOGIE CELLULAIRE : le "patch-clamp" | 155 |

| | |
|---|------------|
| 1. Les différentes configurations de "patch-clamp" | 156 |
| 2. Propriétés électriques passives de la membrane plasmique | 158 |
| 3. Dispositif expérimental | 158 |
| 4. Fabrication des pipettes de "patch-clamp" | 160 |
| 5. Solutions expérimentales | 161 |
| 5.1 Solutions extracellulaires..... | 162 |
| 5.2 Solutions intracellulaires | 162 |
| 6. Protocoles expérimentaux | 163 |
| 7. Limites de la technique de "patch-clamp" | 164 |
| 7.1 "Run-down" | 164 |
| 7.2 Artefacts membranaires | 164 |
| VIII. MIGRATION EN TRANSWELL | 166 |
| IX. TRANSFECTION CELLULAIRE TRANSITOIRE PAR DES ARN INTERFERENTIELS (TECHNIQUE DE SiRNA) | 167 |
| X. STATISTIQUES | 168 |
| Résultats | 169 |
| I. MISE EN EVIDENCE D'UNE ECC DANS LES CELLULES DENDRITIQUES HUMAINES | 172 |
| 1. Induction d'une ECC en réponse à la Thapsigargine | 172 |
| 2. Caractérisation d'une ECC en réponse au LPS et au TNF-α | 173 |
| 3. Caractérisation de l'ECC induite par le Zymosan | 174 |
| 4. Induction d'un courant calcique, I_{CRAC}, résultant de cette ECC | 175 |
| II. IMPLICATION DE CETTE ECC DANS LES FONCTIONS DE LA CELLULE DENDRITIQUE HUMAINE | 176 |
| 1. Rôle de l'ECC dans l'expression des marqueurs de maturation phénotypique | 177 |
| 2. Rôle de l'ECC sur la capacité de sécrétion des cellules dendritiques humaines | 178 |
| 2.1 Sécrétion de cytokines par les cellules dendritiques humaines | 178 |
| 2.2 Synthèse de cytokines par les cellules dendritiques humaines..... | 180 |
| III. CARACTERISATION MOLECULAIRE DE L'ENTREE CAPACITIVE DE CALCIUM | 181 |
| 1. Mise en évidence des ARN messenger de ORAI-1 et STIM-1 | 181 |
| 2. Expression et co-localisation de ORAI-1 et STIM-1 dans les cellules dendritiques humaines | 182 |

| | |
|--|------------|
| 3. Implication de ORAI-1 et STIM-1 dans les fonctions des cellules dendritiques humaines | 183 |
| 3.1 Rôle de ORAI-1 et STIM-1 dans l'ECC, dans les DC immatures..... | 184 |
| 3.2 Rôle de ORAI-1 et STIM-1 dans l'expression des marqueurs de maturation phénotypique | 185 |
| 3.3 La synthèse d'IFN- γ est sous la dépendance du complexe ORAI-1 et STIM-1 | 186 |
| IV. DEVENIR DU CALCIUM ISSU DE L'ECC..... | 188 |
| 1. Profil électrophysiologique des cellules dendritiques immatures | 188 |
| 1.1 Canaux sensibles au Calcium induisant des courants sortants | 188 |
| 1.2 Caractérisation des canaux potassiques présents sur les DC humaines..... | 190 |
| 1.3 Caractérisation moléculaire des canaux potassiques KCa1.1 et KCa3.1 | 191 |
| 2. Impact des inhibiteurs des canaux potassiques sur le phénotype de maturation..... | 192 |
| 3. Impact des inhibiteurs des canaux potassiques sur l'expression des marqueurs de migration: CCR5 et CCR7 | 194 |
| 4. Impact des inhibiteurs des canaux potassiques sur la migration des DC humaines.. | 195 |
| V. PARTICIPATION A DES TRAVAUX SUPPLEMENTAIRES | 197 |
| 1. L'activation des lymphocytes T CD8⁺ allogéniques cytotoxiques, par les cellules dendritiques humaines est sous la dépendance de la synthèse d'IFN-γ, par ces mêmes cellules dendritiques..... | 197 |
| 2. Mise au point de la technique d'ARN interférence sur les cellules dendritiques humaines | 199 |
| 3. Impact des immunosuppresseurs sur la physiologie calcique des cellules dendritiques humaines : le MPA (acide mycophénolique)..... | 200 |
| Discussion & Perspectives | 202 |
| 1. Le Calcium est un messager de la maturation des cellules dendritiques humaines... | 203 |
| 2. Le complexe ORAI / STIM gouverne l'ECC des DC humaines induite par les différents agents de maturation | 206 |
| 3. Les fonctions de la DC humaine sont dépendantes du Calcium | 207 |
| 4. Activation des canaux potassiques par le Calcium intracellulaire | 209 |
| 5. Rôle du mécanisme SOCE dans l'immunodéficience..... | 213 |
| 6. L'homéostasie calcique peut être gérée par des canaux calciques différents des SOCs | 214 |
| 6.1 Le rôle des canaux Ca _v dans la physiologie des lymphocytes T..... | 214 |

| | |
|--|------------|
| 6.2 Les effets immunosuppresseurs des inhibiteurs des canaux calciques dépendants du potentiel : les canaux Ca_v | 215 |
| 6.3 Les traitements de maladies auto-immunes ciblant les canaux ioniques..... | 216 |
| Conclusion..... | 217 |
| Bibliographie..... | 220 |
| Annexes..... | 250 |
| Résumé..... | 281 |
| Résumé en anglais | 281 |

Liste des tableaux

| | |
|---|------------|
| Tableau 1 : Résumé des caractéristiques des cellules dendritiques tolérogènes | 92 |
| Tableau 2 : Classification pharmacologique des CCVD..... | 98 |
| Tableau 3 : Nomenclature des CCVD | 99 |
| Tableau 4 : Nomenclature et caractéristiques pharmacologiques des KCa. | 122 |
| Tableau 5 : Composition des différentes solutions extracellulaires utilisées (en mM). . | 146 |
| Tableau 6 : Amorces de PCR | 153 |
| Tableau 7 : Composition des différentes solutions extracellulaires utilisées (en mM). . | 162 |
| Tableau 8 : Composition des milieux intrapipette (MIP) utilisés en configuration patch rompu. | 163 |

Liste des figures

| | |
|---|-----|
| Figure 1: Les différents types de PRR exprimés par les cellules dendritiques..... | 43 |
| Figure 2: Les différentes voies de signalisation impliquées dans la maturation des cellules dendritiques..... | 51 |
| Figure 3: Apprêtement des antigènes endogènes par les molécules du CMH de classe I | 55 |
| Figure 4: Apprêtement des antigènes exogènes par les molécules du CMH de classe II. | 56 |
| Figure 5 : Mécanismes cellulaires de l'alloréactivité | 60 |
| Figure 6 : Les différentes voies d'allorecognition | 61 |
| Figure 7 : Modèle de rejet aigu | 65 |
| Figure 8 : Modèle de rejet chronique | 67 |
| Figure 9 : Sites d'action des différents immunosuppresseurs..... | 68 |
| Figure 10 : mTOR et la rapamycine régulent la fonction des APC..... | 71 |
| Figure 11 : Les différentes voies de la tolérance immune..... | 75 |
| Figure 12 : Mécanismes passifs de la tolérance périphérique des lymphocytes T | 78 |
| Figure 13 : Mécanismes d'action des lymphocytes T régulateurs | 85 |
| Figure 14 : Génération de DC tolérogènes <i>in vitro</i> | 91 |
| Figure 15 : Signalisation et homéostasie calcique des cellules excitables..... | 94 |
| Figure 16 : Transport du Ca ²⁺ dans un cardiomyocyte ventriculaire..... | 95 |
| Figure 17 : Mécanismes de régulation du Ca ²⁺ dans les lymphocytes B. | 96 |
| Figure 18 : Représentation schématique des différents états des canaux calciques activés par le voltage..... | 100 |
| Figure 19 : Représentation schématique de la structure des canaux calciques..... | 101 |
| Figure 20 : Voies de signalisation schématique dans les LT. | 105 |
| Figure 21 : Mécanisme SOCE dans l'activation du TCR..... | 107 |
| Figure 22 : Caractéristiques du canal et du courant CRAC | 108 |
| Figure 23 : Mode d'action de la thapsigargine. | 109 |
| Figure 24 : ORAI-1, le canal CRAC | 110 |
| Figure 25 : STIM-1, le « senseur » calcique du RE..... | 111 |
| Figure 26 : CRACR2A, le modulateur du complexe moléculaire CRAC | 112 |
| Figure 27: Activation du courant I _{CRAC} | 113 |
| Figure 28 : Mécanisme d'action du modulateur CRACR2A | 114 |
| Figure 29 : Les différentes familles de TRP et leur structure | 117 |

| | |
|---|------------|
| Figure 30 : Motifs structuraux des différents canaux potassiques et leurs précurseurs présumés..... | 120 |
| Figure 31 : Activation de la dégranulation du mastocyte par les IgE | 128 |
| Figure 32 : FcγRIII : Activation dépendante du Ca²⁺ dans les neutrophiles et les macrophages | 129 |
| Figure 33 : Signal calcique résultant de l'activation du TCR..... | 132 |
| Figure 34 : Inhibition du signal calcique induit par l'engagement du BCR par le FcγRIIb..... | 133 |
| Figure 35 : Communication de l'influx calcique par les nanotubules..... | 136 |
| Figure 36 : Structure chimique du Fura-2AM extracellulaire et du Fura-2 après clivage du groupement AM par des estérases intracellulaires..... | 144 |
| Figure 37 : Schéma général de la transcription inverse d'ARNm en ADNc utilisant comme amorce un oligo dT. | 149 |
| Figure 38 : Les trois étapes successives d'un cycle de la réaction de PCR..... | 151 |
| Figure 39 : Schéma des quatre principales configurations de la technique du patch-clamp. | 156 |
| Figure 40 : Représentation schématique de l'installation de patch clamp. | 159 |
| Figure 41 : Schéma simplifié d'une cellule en configuration cellule entière et du circuit électrique équivalent à une portion de membrane..... | 165 |
| Figure 42 : Représentation schématique des tests de migration <i>in vitro</i>. | 166 |
| Figure 43 : Expression des marqueurs de maturation des DC humaines en fonction de la concentration extracellulaire en Ca²⁺..... | 171 |
| Figure 44 : Caractérisation de l'ECC dans les DC humaines. | 173 |
| Figure 45 : Caractérisation de l'ECC durant les évènements précoces de maturation des DC humaines, traitées par le LPS ou le TNF-α. | 174 |
| Figure 46 : Caractérisation de l'ECC durant les évènements précoces de maturation des DC humaines, traitées par le Zymosan. | 175 |
| Figure 47 : Courant I_{CRAC}, d'une DC humaine, en réponse à l'application de TG. | 176 |
| Figure 48 : Expression des marqueurs de maturation dans les DC humaines, en présence ou non du 2-APB. | 177 |
| Figure 49 : Cytokines sécrétées par les cellules dendritiques humaines. | 179 |
| Figure 50 : Marquages intracellulaires des cytokines, dans des DC humaines..... | 180 |

| | |
|--|------------|
| Figure 51 : ARN messagers de ORAI-1 et STIM-1 dans les DC humaines traitées par différents agents de maturation, en présence ou non de 2-APB. | 181 |
| Figure 52 : Expression deORAI-1 et STIM-1 dans les DC humaines. | 183 |
| Figure 53 : Implication de ORAI-1 et STIM-1 dans l'ECC, induite par la TG, dans les DC immatures..... | 184 |
| Figure 54 : Rôle de ORAI-1 et STIM-1 dans l'expression des marqueurs de maturation. | 185 |
| Figure 55 : Implication des protéines ORAI-1 et STIM-1 dans la sécrétion de cytokines, par le DC humaines..... | 186 |
| Figure 56 : Caractérisation électrophysiologique de courant potassique dans la cellule dendritique humaine immature. | 189 |
| Figure 57 : Identification du canal KCa3.1 dans les DC humaines..... | 190 |
| Figure 58 : Identification du canal KCa1.1 dans les DC humaines..... | 191 |
| Figure 59 : Mise en évidence des canaux KCa1.1 et KCa3.1 en RT-PCR et épifluorescence..... | 192 |
| Figure 60 : Impact du TRAM-34 et de l'IbTx sur les marqueurs de maturation CD25 et CD83 des hDC..... | 193 |
| Figure 61 : Impact du TRAM-34 et de l'IbTx sur les marqueurs de migration CCR5 et CCR7 des cellules dendritiques immatures et maturés en présence de LPS pendant 18 hrs. | 194 |
| Figure 62 : Impact du TRAM-34 et de l'IbTx sur la capacité de migration des cellules dendritiques humaines..... | 196 |
| Figure 63 : Schéma simplifié de la technique d'ARN interférentiels | 200 |
| Figure 64 : Effet du MPA sur la concentration intracellulaire en Ca²⁺. | 201 |
| Figure 65 : Mécanisme d'activation des DC humaines par le LPS | 206 |
| Figure 66 : Orientation lymphocytaire T | 208 |
| Figure 67 : Mécanisme d'activation des DC humaines par le LPS | 212 |
| Figure 68 : Homéostasie calcique au cours des évènements précoces de la maturation des DC humaines..... | 218 |

Liste des annexes

| | |
|-----------------------|------------|
| Annexe 1 | 251 |
| Annexe 2 | 280 |

Liste des abréviations

2-APB : 2-Amino-Phenyl-Borate
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ADNc : Acide Désoxyribonucléique Complémentaire
Ag : Antigène
AHNAK : AHNAK nucleoprotein
AID : Alpha Interacting Domain
AKAP : A Kinase Anchoring Protein
AM : Aceto-Methylester
APC : AlloPhycoCyanine
ARN : Acide RiboNucléique
ATP : Adénosine TriPhosphate
BCR : B Cell Receptor
BDCA: Blood Dendritic Cell Antigen
BID : Bêta Interacting Domain
Ca²⁺ : Calcium
CaCl₂ : Calcium Chloride
CaMK : CalModulin Kinase
CARD : CAspase Recruitment Domain
Ca_v : Voltage-dependent calcium channel
CCL : chemokine ligand
CCR : chemokine receptor
CD : Classe de Différenciation
CLIP: Class II associated Invariant chain Peptide
CLR : C Lectin Receptor
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA: cellule présentatrice d'antigène
CR2: complement receptor 2
CRAC : Calcium-Released Activated Calcium
CRACM : CRAC Molecule
CRACR2 : CRAC Regulator 2
CREB: cAMP element response binding protein
CTL: cytotoxic T lymphocyte
CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen-4
CXCL: CXC chemokine Ligand
DAG : Di-Acyl-Glycerol

DAMP : Damaged Associated Molecular Patterns
DC : Dendritic cells utilisé pour Cellule Dendritique
DC-SIGN: Dendritic Cell Specific Intracellular adhesion molecule Grabbing non-Integrin
DHPR : DiHydroPyridine Receptor
dsRNA : ARN double brin
EGTA : Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
ELISA : Enzyme Linked Immonosorbant Assay
ERK: Extracellular signal-Related Kinase
FITC : Fluorescein IsoThioCyanate
Flt3 : FMS-like tyrosine kinase 3
Foxp3 : Forkhead box p3
GTR : Glucocorticoid Induced Tumor necrosis factor Receptor
GM-CSF : Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
GPCR : G Protein Coupled Receptor
GVHD: graft versus host disease
HEK : Human Embryonic Kidney cells
HLA: human leukocyte antigen
HMGB : High Mobility Group Box
HSP : Heat Shock protein
IbTx : Iberiotoxin
ICAM : Inter Cellular Adhesion Molecule
IFN : interferon
Ig : Immunoglobuline
IKK: Inhibitor of NF- κ B Kinase
IL : InterLeukine
ILT3: immunoglobulin-like transcript 3
IMF: Intensité Moyenne de Fluorescence
IMPDH: inosine monophosphate dehydrogenase
IP₃ : Inositopl tri-phosphate
IRAK : Interleukin 1 Receptor Associated Kinase
IRF : Interferon Regulator Factor
JNK: c-Jun N-terminal Kinase
K⁺ : potassium
KCl : Potassium Chloride
KOH : Potassium Hydroxide
KO : Knock-Out
K_v : Voltage-dependent potassium channel

LLR : Leucin Rich Repeat
LPS : LipoPolySaccharide
MAPK : Mitogen –Activated Protein Kinases
MEK : MAPKK (MAP Kinase Kinase)
MgCl₂ : Magnesium Chloride
MKK : MAP Kinase Kinase
MIP : Milieu Intra-Pipette
MMF: Mycophenolate Mofetil
MPA: Acide Mycophénolique
mTOR: mammalian Target Of Rapamycin
Myd88: Myeloid differentiation primary response gene (88)
MMP : Matricial MetalloProtease
Na⁺ : sodium
NaCl : Sodium Chloride
NaOH : Sodium Hydroxide
Na_v : Voltage-dependent sodium channel
NCX : Na/Ca Exchanger
NFAT : Nuclear Factor of Activated T-cells
NF-κB : Nuclear Factor κB
NK : natural killer
NLR : NOD Like Receptor
NOD : Nucleotide Oligomerization Domain
OLS : Organe Lymphoïde secondaire
PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS : phosphate buffered saline
pDC : Cellule Dendritique plasmacytoïde
PD-1 : Programmed Death 1
PDL-1 : Programmed Death 1 Ligand
PE : Phycoerythrin
Pe-Cy5 : Phycoerythrin-Cyanine 5
PGE2 : ProstaGlandine E2
PI3K : PhosphatidylInositol 3-Kinase
PIP₂ : Phosphatidyl-inositol di-phosphate
PKA : Protein Kinase A
PKC : Protein Kinase C
PKG : Protein Kinase G
PLC : PhosphoLipase C

PMA : Phorbol Myristic Acetate
PMCA : Plasma membrane Ca²⁺-ATPase
PRR : Pathogen Recognition Receptor
PSS : Physiological Saline Solution
RBL : lignée de mastocytes de rat
RE : Réticulum Endoplasmique
rh : recombinant human
RIP-1 : Receptor Interacting Protein 1
RLH : RIG Like receptor
RNA : RiboNucleic Acid
SCID : Severe Combined Immunodeficiency Syndrome
SERCA : Sarcoplasmic-Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase
si-RNA : Small Interference RNA
SOCE : Store-Operated Entry
SOCs : Store-Operated Channels
STIM : STromal Interacting Molecule
SVF : sérum de veau foetal
TAB : TAK-1 Binding Protein
TAK : TGF- β -Associated Kinase
TAP : Transporter Associated with antigen Processing
TCR : T cell receptor
TG : Thapsigargin
TGF- β : Transforming Growth Factor β
Th : T helper
TIR : Toll/IL-1R domain
TIRFM : Total Internal Reflexion Microscopy
TLR : Toll Like Receptor
TNF- α : Tumor Necrosis Factor α
TNF-R : TNF- α Receptor
TRADD : TNF-R Associated DD protein
TRAIL-DR5 : TNF Apoptosis InducingLigand Death Receptor 5
TRAF : TNFR-Associated Factor
TRP : Transient Potential Receptor
UBC : UBiquitin-Conjugated enzyme
UEV1A : Ubiquitin-canjugated Enzyme Variant 1

Introduction

La transplantation d'organes est la seule issue thérapeutique pour beaucoup de pathologies qui entraînent une perte de fonction irréversible d'organes vitaux. Les progrès majeurs réalisés au cours des 20 dernières années ont abouti à une augmentation significative du nombre de patients pouvant avoir accès à une transplantation. Ainsi, en 2008, 4620 greffes ont été réalisées en France dont 2937 transplantations rénales.

Depuis une vingtaine d'années, de nombreux progrès ont été réalisés grâce notamment à une technique de greffe de mieux en mieux maîtrisée et des résultats en termes de durée et de qualité de vie en constante progression. En effet, le rejet aigu d'allogreffe est maintenant contrôlé de manière très efficace pour la majorité des patients comme en témoigne les taux de survies des greffons extrêmement bons dans les trois premières années qui suivent la transplantation. Ce progrès a été principalement obtenu grâce au développement de très nombreux médicaments immunosuppresseurs chimiques et biologiques.

Cependant, ces traitements appliqués de manière chronique et en association dépriment l'ensemble du système immunitaire du receveur. Cette action est très efficace mais dénuée de spécificité pour les antigènes du greffon et est à l'origine d'effets secondaires graves à long terme comme l'augmentation d'infections opportunistes et l'apparition de cancers (viro-induits notamment). D'autre part, la diminution nette de l'incidence du rejet aigu n'a pas pour autant permis d'enrayer la survenue du rejet chronique avec notamment la perte d'un tiers des greffons durant les 10 premières années post-transplantation. Le mécanisme est assez simple mais difficile à combattre puisque les traitements actuels n'arrivent pas à le maîtriser efficacement : l'inflammation qui règne au niveau du greffon provoque une fibrose des vaisseaux dont les parois s'épaississent lentement. L'irrigation devient alors insuffisante et les fonctions de l'organe se détériorent.

Il apparaît donc important de reconsidérer les stratégies actuelles d'immuno-intervention afin d'induire une tolérance immunitaire spécifique vis-à-vis des alloantigènes du greffon. Ainsi, une meilleure connaissance des mécanismes conduisant au développement de la tolérance immunitaire ainsi que ceux impliqués dans le développement des lésions du rejet chronique permettra de mettre au point de nouvelles stratégies thérapeutiques mieux ciblées. Parmi les cellules du système immunitaire impliquées dans le rejet, les cellules dendritiques jouent un rôle capital. Ce sont des cellules présentatrices d'antigène professionnelles caractérisées par une grande plasticité qui leur permet à la fois de générer des réponses immunitaires effectrices pour éliminer les pathogènes et d'induire une tolérance périphérique selon les signaux qu'elles perçoivent. La grande plasticité des cellules dendritiques fait de la

manipulation de ces cellules un champ d'investigation pour une potentielle thérapie cellulaire par des DC pro-toléro-gènes afin de moduler la réponse immune.

Par ailleurs, le Calcium (Ca^{2+}) est un composant essentiel de la vie cellulaire. Mais, dans la cellule dendritique (DC) humaine, son rôle reste encore flou. L'augmentation de sa concentration intracellulaire est un phénomène biologique ubiquitaire et essentiel au bon fonctionnement cellulaire. Les fonctions biologiques qui y sont liées sont de grande diversité : de la différenciation cellulaire (cellule lymphocytaire T) à l'apoptose. De ce fait, l'homéostasie calcique doit donc être minutieusement régulée. Contrairement aux cellules excitables, les mécanismes de régulation de cette homéostasie ionique restent encore peu connus pour les cellules non-excitables, comme les DC humaines.

Depuis quelques dizaines d'années, de nombreuses équipes s'intéressent aux mécanismes d'entrée, et sa modulation, de ce Ca^{2+} . Mais, ce n'est que très récemment que les entités moléculaires de cette entrée calcique ont été décrites. En effet, la découverte du canal ORAI-1, en 2006, a permis une explosion de la recherche dans ce domaine d'investigation : la régulation calcique dans l'activation du système immunitaire. Enfin, ces dernières années, des modulateurs de cette entrée de Ca^{2+} , dans la cellule, ont été décrits. Les canaux TRPM4, KCa3.1 ou $\text{K}_v1.3$ sont les principaux représentants des modulateurs de ce mécanisme d'entrée calcique dans les cellules non-excitables. Nous avons donc, dans un premier temps, caractérisé une entrée de Ca^{2+} dans la DC humaine, en réponse à une déplétion des stocks calciques du RE : une ECC (Entrée Capacitive de Calcium). Par la suite, nous avons analysé le rôle de cette entrée dans les principales fonctions de la DC humaine. La caractérisation moléculaire de ce mécanisme SOCE (Store-Operated Calcium Entry) a fait l'objet d'une grande partie de ce travail. Enfin, nous nous intéressé au devenir du Ca^{2+} , issu de cette ECC, dans les fonctions des DC humaines.

Les résultats obtenus dans le cadre de ce travail de thèse seront exposés après une revue bibliographique. Les cellules dendritiques seront tout d'abord décrites. Nous nous intéresserons ensuite à l'immunologie de greffe et plus particulièrement aux différentes voies d'alloreconnaissance et au concept de la tolérance immune. L'homéostasie calcique des cellules non-excitables, en prenant comme exemple les cellules immunitaires, sera développée dans une troisième partie. Enfin, la dernière partie de ce travail sera consacrée à une conclusion générale.

Revue bibliographique

I. LES CELLULES DENDRITIQUES

1. Généralités

Les cellules dendritiques sont les principales cellules présentatrices d'antigène professionnelles, capables d'activer des lymphocytes T naïfs. Grâce à leurs récepteurs (PRRs pour Pattern Recognition Receptors) reconnaissant des motifs conservés de micro-organismes (PAMPs pour Pathogen Associated Molecular Patterns), elles jouent le rôle de « sentinelles » en périphérie. Leur capacité à capturer et présenter les antigènes à leur surface leur permet d'activer ensuite les lymphocytes T naïfs et mémoires. Les cellules dendritiques font donc le lien entre immunité innée et immunité adaptative.

Les cellules dendritiques sont présentes dans l'organisme sous deux états : immature et mature. Les cellules dendritiques immatures, présentes au niveau de la majorité des tissus, jouent le rôle de « sentinelles ». Grâce à leur importante capacité d'endocytose, elles captent les antigènes. Cette étape génère des signaux qui rendent les cellules dendritiques matures ; elles perdent alors leur capacité d'endocytose, apprêtent les antigènes et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires où elles présentent aux lymphocytes T naïfs ou mémoires des peptides dérivés de ces antigènes conjointement avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). L'activation des lymphocytes T découle de la double reconnaissance CMH/peptide par le complexe TCR et de l'interaction entre les molécules de co-stimulation présentes à la surface des cellules dendritiques et celles exprimées par les cellules T.

Les cellules dendritiques jouent un rôle important dans l'initiation de la réponse immune effectrice mais sont également impliquées dans l'induction et le maintien de la tolérance immunitaire. Il existe plusieurs populations de cellules dendritiques, classées selon leur origine et leur localisation. L'orientation de la réponse immunitaire dépend de l'état d'activation des cellules dendritiques mais aussi de la sous-population mise en jeu dans cette réponse. La majeure partie de ce chapitre sera consacrée aux cellules dendritiques myéloïdes humaines qui ont été l'objet de ce travail de thèse.

2. Ontogénie des cellules dendritiques

Les travaux de recherche concernant les cellules dendritiques ont été abondants ces dernières années. Ainsi, les différentes sous-populations, les fonctions et les localisations des cellules dendritiques humaines sont clairement établies alors que leur origine précise et leurs précurseurs restent mal connus.

Les cellules dendritiques sont des leucocytes issus de la moelle osseuse, à l'exception des cellules dendritiques folliculaires qui ont une origine stromale (Rossi and Young 2005). A cause de leurs similitudes fonctionnelles avec les monocytes, les cellules dendritiques ont été originellement considérées comme appartenant à la lignée myéloïde. Ce concept a été renforcé par la génération de cellules dendritiques myéloïdes à partir de monocytes et de cellules souches CD34⁺ (Sallusto and Lanzavecchia 1994; Caux, Vanbervliet et al. 1996). Toutefois, des études effectuées chez la souris ont montré que des cellules dendritiques pouvaient avoir une origine lymphoïde. En effet, Wu *et al* ont différencié des CD4⁻CD8⁻CD3⁻CD44⁺CD25⁺ murins en cellules dendritiques alors qu'elles sont incapables de se différencier en cellules myéloïdes (Wu, Li et al. 1996).

Ainsi, le processus de différenciation en cellules dendritiques semble complexe, d'autant plus que d'autres études soulignent que des cellules dendritiques murines myéloïdes et plasmacytoïdes peuvent être générées à partir de précurseurs myéloïdes et lymphoïdes exprimant le Flt3 (FMS-like tyrosine kinase-3) (Wu, Li et al. 1996; D'Amico and Wu 2003; Karsunky, Merad et al. 2003). Enfin, il semblerait que des cellules dendritiques plasmacytoïdes puissent se différencier en cellules dendritiques myéloïdes conventionnelles suite à une infection virale (Zuniga, McGavern et al. 2004).

Contrairement aux autres cellules de la lignée hématopoïétique telles que les cellules B, NK, T, les monocytes ou encore les neutrophiles, la différenciation en cellules dendritiques semble donc plus complexe et flexible. Ces observations ont conduit au concept de plasticité fonctionnelle des précurseurs avec une rétention prolongée du potentiel myéloïde. Ce modèle suggère que toutes les DC peuvent se différencier à divers stades, les sous-populations de DC étant générées par l'influence de l'environnement local sur les précurseurs relativement plastiques (Shortman and Naik 2007). Cette plasticité des précurseurs permettrait la présence de cellules dendritiques dans l'organisme dans toutes les situations.

3. Classification des cellules dendritiques humaines

Les cellules de Langerhans, présentes au niveau de la peau, ont été les premières cellules dendritiques découvertes en 1868 par Paul Langerhans. A cette époque, elles étaient considérées comme des terminaisons nerveuses (Rossi and Young 2005). Ce n'est qu'une centaine d'années plus tard, en 1973 que Steinman et Cohn identifient des cellules avec une morphologie semblable dans la rate de souris et les baptisent « cellules dendritiques » compte-tenu de leur morphologie particulière en forme d'arbre ou de dendrites (du grec « dendron » signifiant arbre) (Steinman and Cohn 1973). Les cellules dendritiques sont présentes dans le sang, la lymphe, le thymus et les organes lymphoïdes secondaires mais également dans des tissus non lymphoïdes comme l'épiderme, le derme, les poumons, l'intestin, le cœur, le foie et les reins. Cependant, leur faible fréquence dans l'organisme (1 à 2% des leucocytes) et le manque de marqueurs spécifiques ont rendu difficile leur caractérisation (Hart 1997; Sato and Fujita 2007). Néanmoins, l'émergence de techniques de différenciation et de culture *ex vivo* et l'apparition d'anticorps monoclonaux spécifiques ont permis de mieux les étudier ces dernières années (Banchereau, Briere et al. 2000).

Les cellules dendritiques humaines sont des leucocytes dérivés de la moelle osseuse (Katz, Tamaki et al. 1979; Rossi and Young 2005). A ce jour, aucun marqueur spécifique de la « lignée » dendritique n'a été identifié, elles sont donc « lin⁻ ». Dans les organes lymphoïdes, on distingue les cellules dendritiques myéloïdes dites « conventionnelles » (CD11c⁺) des cellules dendritiques plasmacytoïdes (CD11c⁻). Les différentes sous-populations de cellules dendritiques sont donc classées selon leur localisation et l'expression différentielle de plusieurs marqueurs de surface (Sato and Fujita 2007).

3.1 Les cellules dendritiques myéloïdes

Les cellules dendritiques myéloïdes humaines dites « conventionnelles » expriment les molécules du CMH de classe II. On distingue deux sous-populations de cellules dendritiques dans le sang périphérique : les CD4⁺, CD1a⁺, CD11c^{high}, BDCA-1/CD1c⁺ (0,6% des cellules mononucléées du sang périphérique : PBMC) et les CD4⁺, CD1a⁻, CD11c^{low}, BDCA-3/CD141⁺ (<0,05% des PBMC) (Sato and Fujita 2007). Ces cellules dendritiques ont la capacité de stimuler les lymphocytes T naïfs et mémoires (Ito, Inaba et al. 1999).

3.2 Les cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes ont été découvertes en 1958 par Lennert et Remmele, dans les zones T des ganglions lymphatiques (Lennert and Remmele 1958). A cette époque, elles étaient considérées comme des cellules plasmacytoïdes à cause de leur ressemblance aux plasmocytes puis plus tard comme des cellules T plasmacytoïdes. Cependant, ces cellules n'expriment pas de marqueurs spécifiques des lymphocytes B ni des plasmocytes. Après la découverte de marqueurs de la lignée myélo-monocytaire, ces cellules ont été appelées « monocytes plasmacytoïdes » ; mais ce n'est qu'en 1999 que les travaux de Siegal *et al.* et de Cella *et al.* ont définitivement identifié les cellules dendritiques plasmacytoïdes dans le sang et dans les organes lymphoïdes secondaires (Colonna, Trinchieri et al. 2004; McKenna, Beignon et al. 2005). Les cellules dendritiques plasmacytoïdes humaines sont caractérisées par le phénotype suivant : CD4⁺, CD45RA⁺, ILT3⁺, ILT1⁻, BDCA-2⁺, BDCA-4⁺, HLA-DR⁺⁺, CD33⁻, CD62L⁺ (Colonna, Trinchieri et al. 2004; Rossi and Young 2005). Contrairement aux cellules dendritiques myéloïdes, elles n'expriment pas CD11c mais sont CD123^{high}.

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes sont les cellules les plus productrices d'IFN- α de l'organisme, ce qui leur confère un rôle majeur dans la réponse anti-virale. Elles reconnaissent les ADN et ARN viraux grâce aux Toll Like Receptors (TLR) 7 et 9. Elles pourraient également intervenir dans les réponses anti-tumorales (McKenna, Beignon et al. 2005). *In vitro*, elles passent de l'état immature à mature en présence d'IL-3 et de CD40L (Colonna, Trinchieri et al. 2004). Les cellules dendritiques plasmacytoïdes sont capables d'orienter la réponse immunitaire vers Th1 ou Th2 (Ito, Amakawa et al. 2004) ; certaines études montrent qu'elles peuvent également induire de la tolérance immune *in vivo* (Ito, Yang et al. 2007).

3.3 Les cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans sont situées dans l'épiderme, les muqueuses et l'épithélium pulmonaire où elles forment un réseau dense grâce à leurs longs prolongements cytoplasmiques (Rossi and Young 2005). Elles expriment des molécules qui leur sont spécifiques : la Langerhine, une lectine de type C qui jouerait un rôle dans la présentation des antigènes glycopeptidiques (Mizumoto and Takashima 2004) et la E-cadherine, une molécule d'adhésion permettant leur rétention dans l'épiderme (Tang, Amagai et al. 1993). Les cellules

de Langerhans sont les seules cellules dendritiques possédant des structures cytoplasmiques appelées granules de Birbeck. Il s'agit d'endosomes lamellaires organisés en strates ayant la forme de raquette de tennis ou de baguette. Les cellules de Langerhans expriment également d'autres molécules caractéristiques de cellules dendritiques comme le CD1a qui leur permettrait de présenter les antigènes lipidiques (Hunger, Sieling et al. 2004; Mizumoto and Takashima 2004). Bien que particulières, les cellules de Langerhans, sont de vraies cellules présentatrices d'antigène professionnelles : après capture d'un antigène, elles migrent vers les organes lymphoïdes secondaires tout en effectuant leur maturation afin de stimuler les lymphocytes T (Hemmi, Yoshino et al. 2001).

3.4 Les cellules dendritiques dermiques et interstitielles

Les cellules dendritiques dermiques et interstitielles complètent la fonction « sentinelle » exercée par les cellules de Langerhans au niveau de l'épiderme. Elles se situent dans le derme, les plaques de Peyer de l'intestin et des poumons, le cœur (associées à de petits capillaires), le foie et les reins (Hart and McKenzie 1988; Prickett, McKenzie et al. 1988). Elles expriment fortement les récepteurs liés à l'endocytose ainsi que les récepteurs de chimiokines inflammatoires (Hart and McKenzie 1988; de Heer, Hammad et al. 2005). On distingue les cellules dendritiques dermiques des autres cellules interstitielles par leur expression du facteur de coagulation XIIIa.

3.5 Les cellules dendritiques thymiques

On distingue deux populations de cellules dendritiques thymiques : les conventionnelles (cDC thymiques) et les plasmacytoïdes (pDC thymiques). Les cDC thymiques de phénotype $CD11c^+ HLA-DR^+ CD45RA^{low} CD83^+ CD4^+$ sont retrouvées dans la médulla ainsi qu'au niveau de la jonction cortico-médullaire (Wu and Shortman 2005). Elles semblent impliquées dans la sélection négative des lymphocytes T auto-réactifs par présentation des antigènes du Soi (Sprent and Webb 1995; Shortman, Vremec et al. 1998). Les pDC thymiques sont $HLA-DR^{low}$, $CD45RA^+$, $CD11c^-$ et $CD123^+$. Elles sont également présentes dans le cortex (Sprent and Webb 1995; Wu and Shortman 2005). Leur rôle dans le thymus reste assez mal compris. Il semble peu probable qu'elles jouent un rôle dans la sélection négative des lymphocytes T étant donné leur faible expression des molécules de CMH de classe II (Wu and Shortman 2005). Quelques études montrent qu'elles pourraient

cependant induire des lymphocytes T régulateurs (Martin and Bayley 2002; Moseman, Liang et al. 2004).

3.6 Les cellules dendritiques folliculaires

Les cellules dendritiques folliculaires sont présentes principalement dans les follicules primaires riches en cellules B et dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires. Contrairement aux autres cellules dendritiques, elles ont une origine stromale (mésenchymateuse et non hématopoïétique) (Hart 1997; van Nierop and de Groot 2002). De même, elles ne présentent pas l'antigène par les molécules du CMH de classe II. Par contre, elles peuvent présenter les antigènes natifs grâce aux récepteurs de la fraction Fc des immunoglobulines FcγRIIb (CD32) et FcεRII (CD23) ainsi qu'aux récepteurs du complément CR2 (CD21) et CR1 (CD35) (Liu, Xu et al. 1997; van Nierop and de Groot 2002). Elles sécrètent également la chimiokine CXCL13, ce qui facilite le recrutement des lymphocytes B. Les cellules dendritiques folliculaires auraient un rôle central dans l'activation et la sélection des lymphocytes B au niveau du centre germinatif et dans le maintien de la mémoire immunologique.

3.7 Les cellules dendritiques associées aux muqueuses

Les cellules dendritiques des muqueuses résident dans les plaques de Peyer, dans les muqueuses du tractus respiratoire et intestinal, la cavité orale, l'appareil uro-génital et dans le mucus des membranes (Liu, Xu et al. 1997; Johansson and Kelsall 2005; Iwasaki 2007). Ces cellules participent principalement au maintien de la tolérance orale mais aussi à la lutte contre les pathogènes (Johansson and Kelsall 2005; Iwasaki 2007). Contrairement au modèle murin, les sous-populations de cellules dendritiques des muqueuses chez l'Homme sont peu caractérisées du fait de leur faible accessibilité. Néanmoins, elles sont principalement définies par leur forte expression du CMH de classe II et par leur capacité allo-stimulatrice (Johansson and Kelsall 2005).

Après cette brève description des différentes populations de cellules dendritiques, le chapitre suivant sera consacré aux cellules dendritiques myéloïdes.

4. Modèles de différenciation des cellules dendritiques *in vitro*

Les cellules dendritiques sont présentes en faible proportion dans l'organisme : elles représentent environ 1 à 2% des leucocytes. Il est donc difficile de les isoler en quantité suffisante pour pouvoir les étudier. Des méthodes de différenciation de cellules dendritiques *in vitro* ont été développées : soit à partir de cellules souches CD34⁺ issues de la moelle osseuse ou de sang de cordon ombilical soit à partir de monocytes du sang périphérique.

4.1 A partir de cellules souches CD34⁺

Les cellules souches CD34⁺ peuvent être isolées de la moelle osseuse ou de sang de cordon ombilical du nouveau-né pour obtenir des cellules dendritiques *in vitro*. La culture de ces cellules avec du GM-CSF (« Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor ») et du TNF- α (Tumor Necrosis Factor alpha) entraîne leur différenciation en deux sous-populations de cellules dendritiques (Caux, Vanbervliet et al. 1996). La première population ressemble aux cellules de Langerhans : elles expriment CD1a, E-Cadhérine, et contiennent des granules de Birbeck. Cette voie est dépendante de la présence de TGF- β (« Transforming Growth Factor β ») confirmant les données sur les souris déficientes en TGF- β qui ne possèdent pas de cellules de Langerhans (Borkowski, Letterio et al. 1996). La seconde population ressemble aux cellules dendritiques interstitielles ou dermiques (Caux, Vanbervliet et al. 1996; Shortman and Liu 2002). Les cellules de Langerhans peuvent également être obtenues à partir de cellules CD34⁺ traitées avec de l'IL-3 et du TNF- α (Caux, Vanbervliet et al. 1996).

Les cellules souches CD34⁺ sont capables de se différencier en cellules dendritiques interstitielles CD11c⁺/CD1a⁻/CD1c⁻, en présence de Flt3L, d'IL-6, d'IL-3 et de SCF (facteur de croissance de cellules souches, « stem cell factor ») (Fadilah, Vuckovic et al. 2007). L'utilisation d'IL-4, de Flt3L, de GM-CSF et de SCF favorise aussi l'émergence de cellules dendritiques interstitielles (Ward, Stewart et al. 2006).

4.2 A partir de monocytes

Chez l'Homme, les monocytes sont les précurseurs les plus fréquemment utilisés pour obtenir des cellules dendritiques *in vitro*. Lorsqu'ils sont cultivés pendant plusieurs jours en présence de GM-CSF et d'IL-4, ils se différencient en cellules dendritiques myéloïdes

immatures (Sallusto and Lanzavecchia 1994). Notons que l'IL-4 peut être remplacée par l'IL-13 (Alters, Gadea et al. 1999). L'addition de TGF- β lors de la différenciation de monocytes cultivées avec du GM-CSF et de l'IL-4 induit des cellules ressemblant aux cellules de Langerhans (Geissmann, Prost et al. 1998). La culture de monocytes en présence de GM-CSF, d'IL-4 et d'IFN- β ou de GM-CSF, de TNF- α et de flt3 ou de GM-CSF, d'IL-3 et de flt3 favorise l'émergence de cellules dendritiques plasmacytoïdes (Huang, Hussien et al. 2001; Brawand, Fitzpatrick et al. 2002; Gilliet, Boonstra et al. 2002).

La maturation de ces cellules dendritiques est caractérisée par l'augmentation de l'expression de CD83, des molécules de co-stimulation et du CMH de classe II. Ce phénomène est obtenu après stimulation des cellules dendritiques immatures par des produits bactériens tels que le LPS (lipopolysaccharide), des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α ou par des cocktails de cytokines composés de TNF- α + IL-1 β + IL-6 + PGE2 (Lee, Truong et al. 2002; Sato and Fujita 2007) ou via le CD40L (dimère ou trimère de CD40L soluble ou interaction avec un lymphocyte T activé) (Caux, Massacrier et al. 1994).

5. Rôle des cellules dendritiques dans l'immunité innée

L'immunité innée est un mécanisme ancien de défense contre les pathogènes. Elle constitue la première ligne de défense durant la période critique suivant l'exposition de l'hôte à un pathogène grâce 1) à la mobilisation précoce des cellules phagocytaires et du complément et 2) à la collecte et à l'interprétation des informations contenues dans l'environnement, fonction assurée essentiellement par les DC qui pourront ensuite informer l'immunité adaptative en stimulant des cellules possédant un récepteur TCR (« T Cell Receptor ») et BCR (« B Cell Receptor »), afin de développer une réponse immune spécifique d'antigènes et d'élaborer une mémoire immunitaire.

Pour exercer pleinement ces fonctions d'initiation de la réponse immune, la DC doit recevoir des signaux lui permettant de déclencher un processus moléculaire de reprogrammation et d'activation génique appelé processus de maturation.

On distingue 4 grandes familles de molécules capables d'induire des signaux de maturation vers la DC : les motifs conservés associés aux pathogènes (PAMP), les molécules associées aux dommages cellulaires (DAMP), les cytokines synthétisées par les cellules de l'environnement où se déclenche la réponse immune qui peuvent donc provenir des cellules

épithéliales, des cellules de l'immunité innée ou des fibroblastes et enfin l'engagement du CD40 à la surface de la DC.

5.1 Récepteurs impliqués dans la reconnaissance des PAMP

La détection des pathogènes microbiens par les cellules du système immunitaire inné repose sur la reconnaissance de motifs moléculaires conservés de ces micro-organismes appelés Profils Moléculaires Associés aux Pathogènes ou PAMPs (Akira and Hemmi 2003). Ces structures hautement conservées ne sont exprimées que par les micro-organismes et sont essentiels à leur survie, limitant ainsi l'apparition de mutants qui pourraient échapper à la reconnaissance. Les motifs les plus connus sont les composants des bactéries tels que le LPS (LipoPolySaccharide) des Gram-, le peptidoglycane des Gram+, les motifs CpG non méthylés caractéristiques du génome bactérien ou encore les ARN double brin des virus. Ces PAMPs sont reconnus par des récepteurs spécifiques appelés récepteurs de reconnaissance de profil moléculaire ou PRR (« Pattern Recognition Receptor »). Les PRR sont actuellement regroupés en 4 grandes familles : les TLR (« Toll Like Receptor »), les lectines de type C, les récepteurs « Scavenger » ainsi que les récepteurs intracellulaires NLR (« NOD Like Receptor ») et RLH (« RIG Like Receptor »). (Figure 1).

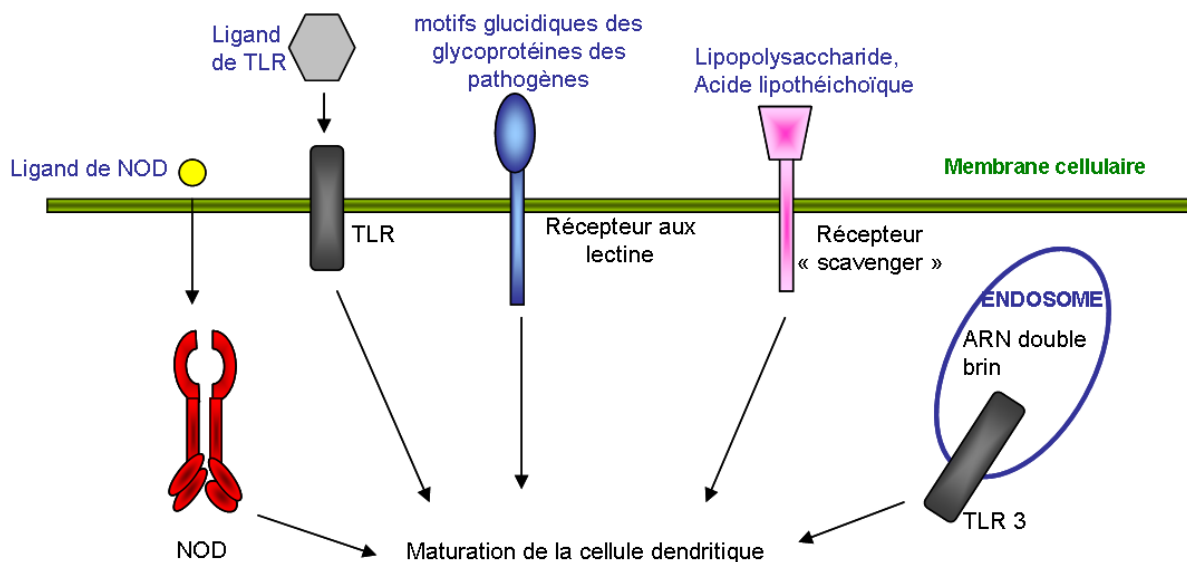


Figure 1: Les différents types de PRR exprimés par les cellules dendritiques

5.1.1 Les TLR

Les récepteurs « Toll » ont été initialement découverts chez la Drosophile. En 1996, Hoffmann et son équipe montrent que ce récepteur participe à l'immunité anti-fongique (Medzhitov 2001). Des homologues de Toll ont ensuite été identifiés chez l'Homme et ont été appelés TLR pour « Toll Like Receptors » (Medzhitov, Preston-Hurlburt et al. 1997). La famille des TLR décrite chez les mammifères compte actuellement 10 membres chez l'Homme et 13 chez la souris. Ces TLR sont des récepteurs soit de surface, soit intracytoplasmiques qui vont reconnaître des motifs moléculaires distincts de composants microbiens (Takeda and Akira 2005). Citons comme exemple le TLR4 qui reconnaît le LPS (Medzhitov, Preston-Hurlburt et al. 1997; Poltorak, He et al. 1998), le TLR9 pour l'ADN bactérien riche en motif non méthylés (CpG) (Hemmi, Takeuchi et al. 2000) et le TLR3 pour les ARN doubles brins (mimés dans les études *in vitro* par le poly I :C) (Alexopoulou, Holt et al. 2001). De plus, ce spectre de reconnaissance est élargi par la capacité de certains de ces TLR à former des hétérodimères (TLR 1 + 2 ; TLR 2 + 6). Les TLR 1, 2, 4, 5 et 6 sont ancrés dans la membrane cytoplasmique alors que les TLR 3, 7, 8 et 9, intracellulaires, se situent au niveau des endosomes (Ahmad-Nejad, Hacker et al. 2002; Heil, Ahmad-Nejad et al. 2003). Les TLR ne sont pas exprimés de façon homogène sur toutes les cellules dendritiques. Ainsi, les cellules dendritiques myéloïdes expriment les TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 et 10 (Pulendran 2004; Ito, Wang et al. 2005; Seya, Funami et al. 2005) alors que les cellules dendritiques plasmacytoïdes expriment les TLR 1, 6, 7, 9 et 10 (Krug, Towarowski et al. 2001; Hornung, Rothenfusser et al. 2002; Rothenfusser, Tuma et al. 2002; Ito, Wang et al. 2005). Les répertoires de TLR exprimés par ces deux types de cellules dendritiques sont donc complémentaires.

Après engagement d'un TLR avec son ligand, les protéines adaptatrices MyD88 et TIRAP/MAL s'associent au domaine TIR (« Toll/IL-1R domain » ayant une grande homologie avec le récepteur de l'IL-1) et initient la formation d'un complexe de signalisation impliquant les protéines IRAKs (kinases associées aux récepteurs des interleukines). Ce processus permet alors l'activation des voies de la famille des MAPK (« Mitogen Activated Protein Kinase ») comme JNK (Jun N terminal kinase) et p38MAPK ainsi que celle du facteur de transcription NF- κ B (Medzhitov 2001; Kawai and Akira 2007). Tous ces effets ont une influence importante sur la stimulation et la différenciation des cellules T (Reis e Sousa, Edwards et al. 2001).

5.1.2 Les lectines de type C

Les lectines de type C (CLR) participent à la réponse innée par leur capacité à se lier aux motifs glucidiques des glycoprotéines du soi et des pathogènes (Rossi and Young 2005). Ces récepteurs, exprimés par les cellules dendritiques, sont spécialisés dans la capture et l'apprêtement de l'antigène. Parmi les lectines de type C, on retrouve le récepteur au mannose (CD206), DEC-205 (CD205), la Langherine (CD207), DC-SIGN (DC-specific intercellular adhesion molecule-grabbing non-integrin) (CD209), BDCA-2 (Blood Dendritic Cell Antigen) et la dectine-1 (Kanazawa 2007). L'activation et la maturation des cellules dendritiques entraînent principalement une diminution de l'expression de ces récepteurs de capture antigénique. Toutefois, l'expression du CD205 peut être augmentée dans les cellules dendritiques dermiques (Ebner, Ehammer et al. 2004; Rossi and Young 2005). Ces molécules ont de nombreuses autres fonctions. Par exemple, DC-SIGN est aussi une molécule d'adhésion qui interagit avec ICAM2 (« Inter Cellular Adhesion Molecule ») pour faciliter la migration des DC (Geijtenbeek, Krooshoop et al. 2000), ou avec MAC1/CD11b pour participer à l'activation des neutrophiles par la DC (van Gisbergen, Sanchez-Hernandez et al. 2005) ou avec ICAM3 pour participer à l'activation du lymphocyte T (Geijtenbeek, Torensma et al. 2000).

5.1.3 Les récepteurs "Scavenger"

Les récepteurs « Scavenger » également appelés « récepteurs éboueurs » en français se lient aux composants des parois des bactéries Gram⁺ et Gram⁻ (lipopolysaccharides, acides lipoteichoïques). Ils interviennent également dans l'élimination des cellules apoptotiques. Les récepteurs Scavenger sont impliqués dans l'adhésion des cellules sur lesquels ils sont exprimés mais aussi dans l'endocytose et la phagocytose des antigènes (Gordon 2002).

5.1.4 Les récepteurs intracellulaires de type NOD

Il existe deux autres familles de récepteurs qui sont impliqués dans la reconnaissance intracellulaire des PAMP dérivés notamment des virus et des bactéries : les récepteurs NLR («NOD Like Receptor ») et les récepteurs RLH (« RIG Like Receptor »). Contrairement aux TLR qui sont liés à la membrane cellulaire, les NLR et les RLH sont des protéines cytosoliques qui reconnaissent la présence de PAMP intracellulaires.

Les deux premiers membres de la famille des NLR qui ont été décrits sont NOD1 (« Nucleotide Oligomerization Domain ») et NOD2 (Inohara, Koseki et al. 1999; Ogura, Inohara et al. 2001). La famille des NLR compte actuellement à la fois des molécules NOD mais aussi des membres du clan NALP (« NACHT/LRR/Pyd-containing Proteins ») (Martinon and Tschopp 2005). L'implication des protéines NOD dans l'immunité anti-microbienne a été récemment décrite grâce à l'étude de souris déficientes en molécules NOD. Les souris déficientes en NOD1 ont une plus forte susceptibilité aux infections par *Helicobacter pylori* (Viala, Chaput et al. 2004) alors qu'une diminution de la clairance de *Listeria monocytogenes* est observée chez les souris déficientes en NOD2 (Kobayashi, Chamaillard et al. 2005). Les récepteurs NOD reconnaissent les pathogènes grâce à leur domaine LRR (« Leucin Rich Repeat ») riche en leucine et à leur domaine CARD (« CASpase Recruitment Domain ») qui permettent la transduction du signal d'activation (Inohara, Ogura et al. 2003). Les agonistes de TLR ainsi que ceux des NLR peuvent agir en synergie dans l'induction de la maturation des cellules dendritiques (Fritz, Girardin et al. 2005; Tada, Aiba et al. 2005). L'engagement des récepteurs NOD par leur ligand induit, de ce fait l'activation de NF- κ B et de p38MAPK (Opitz, Puschel et al. 2006). Ces deux récepteurs intracellulaires peuvent agir en synergie avec les TLR pour l'activation de la cellule dendritique (Tada, Aiba et al. 2005).

Parmi les RLH, on retrouve les deux membres principaux, RIG-I (ou DDX58) et MDA5 (ou Helicard) qui partagent deux domaines N terminaux CARD suivis d'un domaine RNA hélicase. Ces récepteurs ont aussi été décrits comme étant importants dans la reconnaissance des ARN simple-brins (ARNsb) positifs ou négatifs. La reconnaissance de l'ARN viral par ces protéines induit la production d'interféron de type I *via* l'activation de NF- κ B (Andrejeva, Childs et al. 2004; Yoneyama, Kikuchi et al. 2004).

5.2 Activation par des molécules endogènes (DAMP)

Des signaux provenant des cellules mortes ou de lysats cellulaires sont capables d'induire la maturation des DC (Gallucci, Lolkema et al. 1999). Les molécules capables d'induire ces signaux sont appelées DAMP pour Damage Associated Molecular Pattern (Seong and Matzinger 2004). Parmi ces DAMP, on retrouve les protéines de stress ou HSP (« Heat Shock Proteins »), la protéine HMGB1 (« High Mobility Group Box 1 ») qui est libérée par les cellules nécrotiques, l'ATP, la β -défensine (peptide anti-microbien) ou encore

certaines composants de la matrice extracellulaire comme l'acide hyaluronique et l'acide urique (Srivastava and Maki 1991; Biragyn, Ruffini et al. 2002; Lotze and Tracey 2005; Rock, Hearn et al. 2005). Ces molécules sont, soit exprimées de façon constitutive et libérées par les cellules nécrotiques ou soit induites lors d'un stress cellulaire en réponse à l'infection par exemple.

Plusieurs études ont ainsi montré que la protéine HMGB1 pouvait induire la migration et l'activation des cellules dendritiques humaines (Messmer, Yang et al. 2004; Dumitriu, Baruah et al. 2005; Dumitriu, Bianchi et al. 2007; Yang, Brook et al. 2007). L'activation des cellules dendritiques par HMGB-1 entraîne une up-régulation de l'expression des molécules de co-stimulation et du CMH de classe II, une augmentation de la synthèse des cytokines pro-inflammatoires IL-1 α , IL-6, IL-12 et TNF- α et des chimiokines CCL19, CXCL8 et CXCL12. Ces DC acquièrent la capacité à stimuler la prolifération de lymphocytes T CD4⁺ allogéniques promouvant ainsi une réponse immune adaptative spécifique (Yang, Brook et al. 2007). L'amplitude de la réponse semble équivalente à celle induite par le LPS, les CpG ou encore la molécule CD40L (Messmer, Yang et al. 2004).

5.3 Activation par des cytokines inflammatoires

Lors d'une infection, les agents pathogènes activent directement les cellules dendritiques mais également indirectement par des facteurs tissulaires inflammatoires produits par les cellules en réponse à l'invasion des pathogènes. Ainsi, les polynucléaires neutrophiles et les macrophages sécrètent des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et le TNF- α suite à la reconnaissance des pathogènes. La PGE2 (Prostaglandine E2) et les interférons peuvent être libérés par les cellules Natural Killers (NK). Ces cytokines peuvent entraîner la maturation des cellules dendritiques humaines et murines (Jonuleit, Kuhn et al. 1997). D'autre part, les interférons de type I, comme l'interféron alpha (IFN- α), produits suite à une infection virale par les pDC par exemple, peuvent également activer d'autres DC (Siegal, Kadowaki et al. 1999). Par ailleurs, des cellules NK activées peuvent aussi induire la maturation des mDC par un mécanisme nécessitant la production d'IFN- γ et un contact cellulaire (Gerosa, Baldani-Guerra et al. 2002).

5.4 Activation par l'engagement du CD40

Des interactions cellule / cellule sont aussi capables d'activer les DC. Par exemple, l'engagement du CD40 par la molécule CD40L (CD154) exprimée sur les lymphocytes activés, est important pour la pleine maturation des DC. La molécule CD40 est une glycoprotéine membranaire de la famille des récepteurs au TNF, exprimée sur les lymphocytes B, les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules épithéliales, certains lymphocytes T activés et les précurseurs hématopoïétiques (Quezada, Jarvinen et al. 2004). Son ligand, CD40L, est exprimé sur les lymphocytes T et les lymphocytes B activés ainsi que sur les plaquettes activées. Par ailleurs, durant la réponse inflammatoire, CD40L est également induit à la surface des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses et des macrophages (Quezada, Jarvinen et al. 2004). L'activation des DC par l'engagement du CD40 entraîne la production de cytokines inflammatoires, l'augmentation des molécules de CMH-II et de la survie des DC (van Kooten and Banchereau 2000). D'autre part, des études ont montré que des anticorps agonistes de CD40 induisaient une autoimmunité systémique ou abolissaient l'état de tolérance. Cet effet était lié à l'action sur les cellules dendritiques (Sotomayor, Borrello et al. 1999; Ichikawa, Williams et al. 2002; Roth, Schwartzkopff et al. 2002). Ces travaux indiquent donc que l'organisme peut passer assez aisément de l'état de tolérance immune à celui d'immunité et que le statut des DC joue un rôle important dans le maintien de cet équilibre *in vivo*.

5.5 Voies de signalisation impliquées dans la maturation des cellules dendritiques

L'engagement des ligands de TLR et du récepteur au TNF- α induit la maturation des cellules dendritiques par l'activation de nombreuses molécules de transduction impliquées dans les différentes voies de signalisation comme celles de NF- κ B ou des MAPK.

5.5.1 Transduction par les TLR

L'engagement des TLR entraîne une signalisation qui est contrôlée majoritairement par la molécule adaptatrice MyD88 (« Myeloid Differentiation primary response protein 88 ») (**Figure 2**) qui contient un domaine TIR et un domaine de mort DD (« Death Domain »)

(Medzhitov, Preston-Hurlburt et al. 1998). La signalisation induite dépend de deux voies : une voie dépendante de la molécule adaptatrice MyD88 et d'une autre voie indépendante de MyD88 (Akira and Takeda 2004). Myd88 est une des cinq molécules adaptatrices ayant une activité prépondérante dans la transduction de signaux induits par les TLR. Myd88 peut s'associer à tous les TLR à l'exception du TLR3 et est indispensable à la synthèse d'IL-6 et d'IL-12p40 (Kaisho and Akira 2006). Elle possède un domaine TIR lui permettant d'interagir avec le TLR et un domaine de mort menant au recrutement de kinases associées aux récepteurs de l'IL-1 (IRAK). Ainsi le recrutement d'IRAK-4 par Myd88 induit celui d'IRAK-1 entraînant par la suite sa liaison avec la molécule TRAF-6 (« TNFR-Associated Factor-6 »). Le complexe TRAF-6/IRAK-1 se désengage ensuite de son récepteur pour interagir avec le complexe TAK1 (« TGF β -Associated Kinase-1 »), TAB1 (« TAK-1 Binding protein-1 ») et TAB2 situé au niveau de la membrane plasmique. IRAK-1 est ensuite dégradé puis le complexe restant subit une translocation dans le cytosol où il se lie avec des ligases ubiquitine : UBC13 (« Ubiquitin-Conjugating enzyme-13 ») et UEV1A (« Ubiquitin-conjugating Enzyme E2 Variant 1 ») dont TRAF-6 induisant l'activation de TAK1. Cette dernière conduit à l'activation d'IKK (« Inhibitor of nuclear factor- κ B-Kinase2) qui va à son tour phosphoryler les I κ Bs. Cette phosphorylation mène à la dégradation d'I κ B et à la libération de NF- κ B (Akira and Takeda 2004). Cette voie de signalisation résulte aussi en l'activation des MAPK dont p38MAPK (Kaisho and Akira 2006), JNK (« c-Jun N-terminal Kinase »), et ERK (« Extracellular signal Related Kinase »). En effet, le complexe TAK-1/TAB1/TAB2 permet aussi de phosphoryler la MKK4/7 (« Map Kinase Kinase ») qui va ensuite activer JNK. L'activation de p38MAPK est induite par la phosphorylation en amont de MKK3/6 par TRAF-6 (Akira and Takeda 2004; Kaisho and Akira 2006). Les TLR activent aussi la MAPKKK : Cot/Tpl2 entraînant ainsi l'activation de MEK1/2 qui va à son tour phosphoryler ERK. Les TLR agissent enfin sur la voie PI3K (« Kinase PI3 ») par la formation d'un complexe entre Myd88 et PI3K. Ce complexe va ensuite induire la phosphorylation de PIP2 (Phosphatidylinositol biphosphate) en PIP3 menant à l'activation de PDK-1 puis à celle d'Akt (Hazeki, Nigorikawa et al. 2007).

L'engagement des ligands de TLR3 et TLR4 induit le recrutement de molécules de transduction indépendantes de Myd88 mais nécessitant une autre molécule adaptatrice TRIF (« TIR domain containing Adapter Protein inducing IFN »). TRIF induit l'activation de TRAF-6 ou de RIP-1 (receptor interacting protein-1) entraînant l'activation des IKK afin d'activer NF- κ B. Par ailleurs, TRIF interagit également avec IKK ϵ et TBK-1 (TANK-binding

kinase 1) phosphorylant ainsi le facteur de transcription IRF3 (« Interferon Regulatory Factor 3 ») nécessaire à la production d'IFN- β (Kaisho and Akira 2006).

5.5.2 Transduction par le récepteur au TNF

Les effets du TNF α (« Tumor Necrosis Factor alpha ») peuvent être médiés par deux récepteurs distincts exprimés à la surface TNF-R1 et TNF-R2 mais seul le TNF-R1 semble impliqué dans les changements fonctionnels et de phénotype des cellules dendritiques (Sallusto, Cella et al. 1995) (**figure 2**). Le TNF-R1 est exprimé à la surface des cellules sous forme de trimère. La liaison du TNF α au TNF-R1 permet la fixation de la protéine TRADD (« TNFR-Associated DD protein »), protéine cytoplasmique contenant une région DD. TRADD est à l'origine de la transduction de signaux via le recrutement de deux autres protéines : RIP-1 (« Receptor-Interacting Protein »), contenant une région DD et TRAF-2. Ensuite le complexe TRADD/TRAF-2/RIP-1 se désengage de son récepteur. RIP-1 recrute alors MEKK-3 (« MAPK Kinase Kinase ») et TAK-1 menant à la dégradation d'I κ B permettant ainsi la translocation nucléaire de NF- κ B. Par ailleurs, ce complexe active MEK-4 et MEK-6 participant de ce fait à l'activation de p38MAPK et de JNK (Kyriakis 1999; Bradley 2008). Le TNF-R1 active aussi d'autres voies de signalisation dont Ras-Raf-MEK1-ERK et PI3K mais les mécanismes impliqués restent actuellement mal connus. La PI3K semble phosphoryler PIP2 en PIP3. Ce dernier active PDK-1, une enzyme induisant la phosphorylation d'Akt et PDK-2 qui va aussi aboutir à la phosphorylation d'Akt en passant par l'activation du complexe mTOR (« mammalian Target Of Rapamicin »). Les voies ERK et PI3K sont préférentiellement engagées dans la survie et la prolifération cellulaire (Bradley 2008).

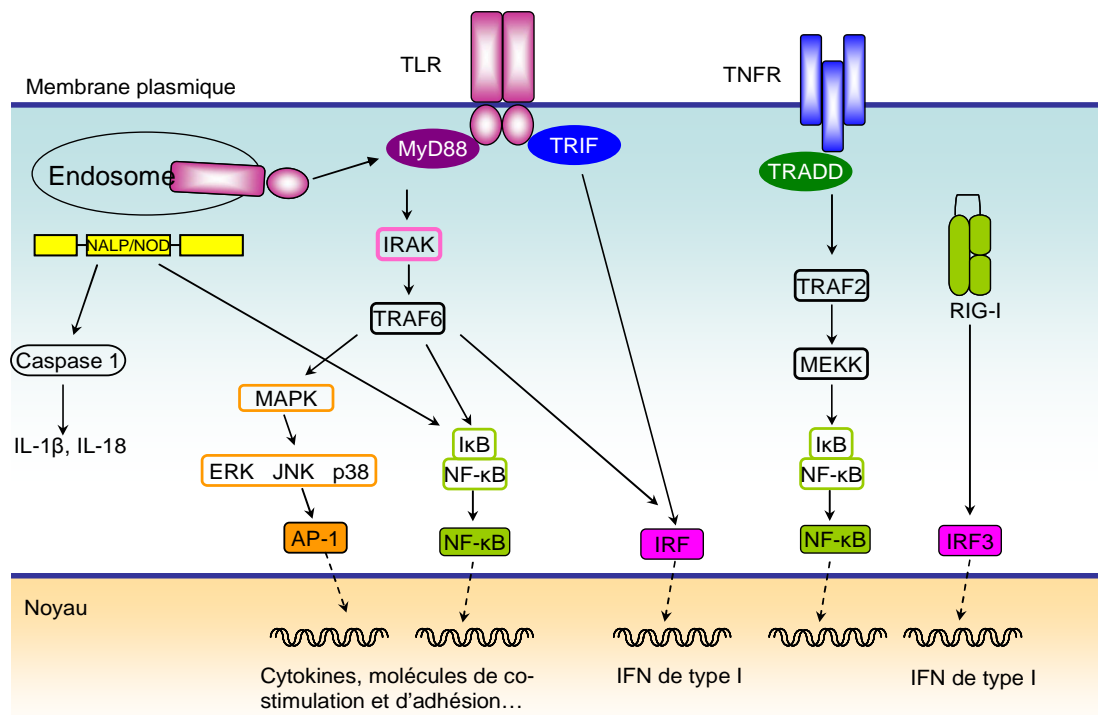


Figure 2: Les différentes voies de signalisation impliquées dans la maturation des cellules dendritiques

5.5.3 La voie NF-kappa B

De nombreux stimuli sont capables d'induire l'activation de la voie NF- κ B dans les cellules dendritiques tels que les ligands de TLR (Takeda, Kaisho et al. 2003), les ligands des récepteurs NOD (Inohara, Ogura et al. 2003), les cytokines dont IL-1 (Vakkila, Demarco et al. 2008) ou le TNF α (Bradley 2008) ou encore des molécules de co-stimulation CD40L (Kawai and Akira 2007; Vakkila, Demarco et al. 2008). Cette activation mène à l'expression de nombreux gènes impliqués dans la maturation de la cellule dendritique en induisant l'expression des molécules de co-stimulation et les molécules du CMH (Rescigno, Martino et al. 1998; Ardeshtna, Pizzey et al. 2000; Yoshimura, Bondeson et al. 2001), la sécrétion de cytokines dont l'IL-12 et le TNF- α (Yoshimura, Bondeson et al. 2001; Jayakumar, Donovan et al. 2008; Vakkila, Demarco et al. 2008).

5.5.4 La voie des MAPK

Les MAPK définissent une famille de protéines impliquée dans la transduction de signaux conduisant à la prolifération, à la différenciation, ou encore à l'apoptose de nombreuses cellules. Chez les mammifères, la voie des MAPK joue aussi un rôle important dans la réponse immune en intervenant aussi bien dans l'initiation de la réponse immune

innée, dans l'activation de la réponse immunitaire adaptative, que dans la mort cellulaire lorsque la réponse immunitaire est terminée (Dong, Davis et al. 2002). Cette famille de protéines peut être divisée en 3 groupes : ERK, JNK, p38MAPK. Ces protéines sont toutes phosphorylées suite à une cascade de phosphorylation d'autres protéines kinases situées en amont dont les MAPKKK (ou MEKK) puis les MAPKK (ou MEK). Les MAPK vont alors, à leur tour, phosphoryler différents substrats en aval tels que des protéines kinases, des facteurs de transcription ou des phospholipases. JNK et p38MAPK sont fortement activés par l'inflammation et les signaux de danger alors qu'ERK est principalement activé par des facteurs de croissance (Dong, Davis et al. 2002; Nakahara, Uchi et al. 2004).

La voie p38MAPK joue un rôle crucial lors de la maturation des cellules dendritiques par le LPS ou par le TNF- α . Son activation participe à l'expression à la surface du CMH de classe II, des molécules de co-stimulation (CD40, CD80, CD86) et de maturation : CD83 (Arrighi, Rebsamen et al. 2001). Par ailleurs, elle est aussi impliquée dans la sécrétion de cytokines inflammatoires telles que l'IL-12p40, l'IL-12p70 et le TNF- α (Arrighi, Rebsamen et al. 2001; Agrawal, Agrawal et al. 2003). Enfin elle contribue à la forte capacité allostimulatrice des cellules dendritiques matures ainsi qu'à la perte de l'endocytose. (Arrighi, Rebsamen et al. 2001; Nakahara, Uchi et al. 2004; Nakahara, Moroi et al. 2006).

Contrairement à la voie p38MAPK, la voie ERK semble bloquer certaines fonctions des cellules dendritiques matures (Agrawal, Agrawal et al. 2003; Dillon, Agrawal et al. 2004; Nakahara, Moroi et al. 2006). Quelques données ont été obtenues sur la participation de la voie JNK dans la maturation des cellules dendritiques mais son implication n'est pas clairement définie (Boisleve, Kerdine-Romer et al. 2005).

6. Rôle des cellules dendritiques dans l'immunité adaptative

Nous venons de voir que les cellules dendritiques sont largement impliquées dans l'immunité innée où elles participent à la reconnaissance des pathogènes grâce à un panel de récepteurs. En outre, les interactions pathogènes / récepteurs participent également activement à l'induction de la réponse immunitaire adaptative contre les antigènes issus de pathogènes (Janeway and Medzhitov 2002; Akira, Uematsu et al. 2006). Cette reconnaissance « microbienne » par les TLR et autres récepteurs conduit à l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaires qui vont aboutir à la maturation phénotypique, à la sécrétion de

cytokines inflammatoires et de chimiokines et vont augmenter la capacité des cellules dendritiques à présenter l'antigène aux lymphocytes T. C'est au cours du phénomène de maturation que les cellules dendritiques migrent de la périphérie où elles ont capturé les antigènes vers les organes lymphoïdes secondaires où elles vont les présenter aux lymphocytes T. C'est pourquoi, les cellules dendritiques contribuent de façon essentielle au phénomène de rejet de greffe puisqu'elles vont présenter les antigènes du greffon du donneur aux lymphocytes T du receveur.

Les cellules dendritiques jouent également un rôle dans l'activation des lymphocytes B et des cellules Natural Killer.

6.1 Capture des antigènes

La capture des antigènes est un évènement clé dans l'induction d'une réponse immune effectrice. Les cellules dendritiques immatures possèdent divers mécanismes permettant la capture des antigènes solubles ou liés à des récepteurs tels que : la phagocytose, la macropinocytose, la micropinocytose et l'endocytose (Banchereau and Steinman 1998).

La phagocytose permet l'internalisation de particules, de micro-organismes ou de cellules mortes par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécifiques de la famille des récepteurs Fc (FcγRI ou CD64, FcγRII ou CD32, FcRIII-CD16) et les récepteurs du complément par un processus dépendant de l'actine. Les antigènes se lient aux récepteurs et sont internalisés par des vésicules recouvertes de clathrine de façon ATP dépendante.

La macropinocytose est un processus endocyttaire dépendant de l'actine qui permet la filtration rapide du milieu extracellulaire afin de détecter la présence d'antigènes solubles par invagination de la membrane plasmique. Une cellule dendritique serait ainsi capable d'ingérer la moitié de son volume cellulaire en une heure (Sallusto, Cella et al. 1995; Banchereau and Steinman 1998).

La micropinocytose, comme la macropinocytose, désigne un mécanisme de filtration de l'environnement mais est caractérisée par la formation de petites vésicules d'environ 80nm. Ces vésicules sont créées après invagination de la membrane plasmique et sont souvent tapissées de clathrines (Swanson and Watts 1995).

L'endocytose ne nécessite pas de filaments d'actine et dépend des protéines Ras (Barbieri, Kohn et al. 1998). Les récepteurs permettant aux cellules dendritiques de capturer les antigènes par endocytose sont les récepteurs Fc, les lectines de type C comme DEC-205

(CD205), le récepteur au Mannose (CD206) ou DC-SIGN (CD209) ainsi que les récepteurs « Scavenger » (Banchereau and Steinman 1998).

6.2 Apprêtement des antigènes

Pour induire une réponse immune efficace, il faut que les cellules dendritiques présentent les antigènes qu'elles ont capturés aux lymphocytes T effecteurs CD4⁺ ou CD8⁺. Après leur capture, les antigènes subissent un processus intracellulaire d'apprêtement. Celui-ci consiste en sa fragmentation en peptides au niveau des compartiments endosomiaux tardifs puis en son chargement sur les molécules du CMH ; les complexes CMH/peptide sont ensuite transportés à la surface de la cellule dendritique pour être présentés aux lymphocytes T. Les peptides dérivés de l'antigène sont présentés en association avec les molécules du CMH de classe I ou de classe II respectivement en fonction de leur origine endogène ou exogène. Cependant, les cellules dendritiques sont capables de présenter les antigènes exogènes avec les molécules du CMH de classe I : c'est le phénomène de « cross présentation » ou « présentation croisée ».

6.2.1 Apprêtement des antigènes endogènes

Les antigènes endogènes sont présentés par les molécules du CMH de classe I. Ces molécules sont constituées d'une chaîne lourde α , glycosylée et polymorphique, constituée de 3 domaines extracellulaires, une région transmembranaire et une région cytoplasmique. Cette chaîne lourde est associée de façon non covalente à une chaîne légère non polymorphique : la β 2-microglobuline. Les antigènes endogènes proviennent de la dégradation de protéines endogènes présentes dans le cytoplasme des cellules dendritiques. Ces protéines peuvent appartenir au « Soi » (renouvellement des protéines intracellulaires normales ou tumorales) ou provenir de virus ou de bactéries à développement intracellulaire (**étape 1 de la figure 3**). Les protéines endogènes sont tout d'abord ubiquitinylées (**étape 2 de la figure 3**) puis dégradées en peptides de 8 à 10 acides aminés par le protéasome, un complexe formé de 14 à 17 sous-unités différentes dont la structure ressemble à celle d'un tonneau (**étape 3 de la figure 3**). Les peptides résultant de cette dégradation sont ensuite pris en charge par une « pompe à peptide » située dans la membrane du réticulum endoplasmique granuleux et constituée d'un hétérodimère de TAP (pour « Transporter associated with antigen processing ») : TAP1 / TAP2 (**étape 4 de la figure 3**). Avant le chargement des peptides, les molécules du CMH de

classe I sont assemblées dans le RE à l'aide de différentes protéines chaperonnes. Ainsi, les chaînes lourdes sont d'abord associées à la calnexine qui aide au repliement correct de glycoprotéines. L'association des chaînes lourdes avec la β 2-microglobuline est accompagnée par le remplacement de la calnexine par une deuxième lectine, la calréticuline, ainsi que par l'entrée en jeu de l'ERp57, une oxydoréductase catalysant probablement la formation des ponts disulfures au sein des chaînes lourdes. Les complexes ainsi formés se lient enfin directement aux pompes TAP, par l'intermédiaire d'une protéine chaperonne spécialisée, la tapasine, constituant ainsi le «complexe de chargement antigénique» des molécules CMH I (**étape 5 de la figure 3**). Une fois l'assemblage terminé, les complexes peptide / CMH I sont transportés à la surface cellulaire par l'intermédiaire de l'appareil de Golgi pour être présentés aux lymphocytes T CD8⁺ (Cresswell 1994; Hart 1997; Ackerman and Cresswell 2004) (**étape 6 de la figure 3**).

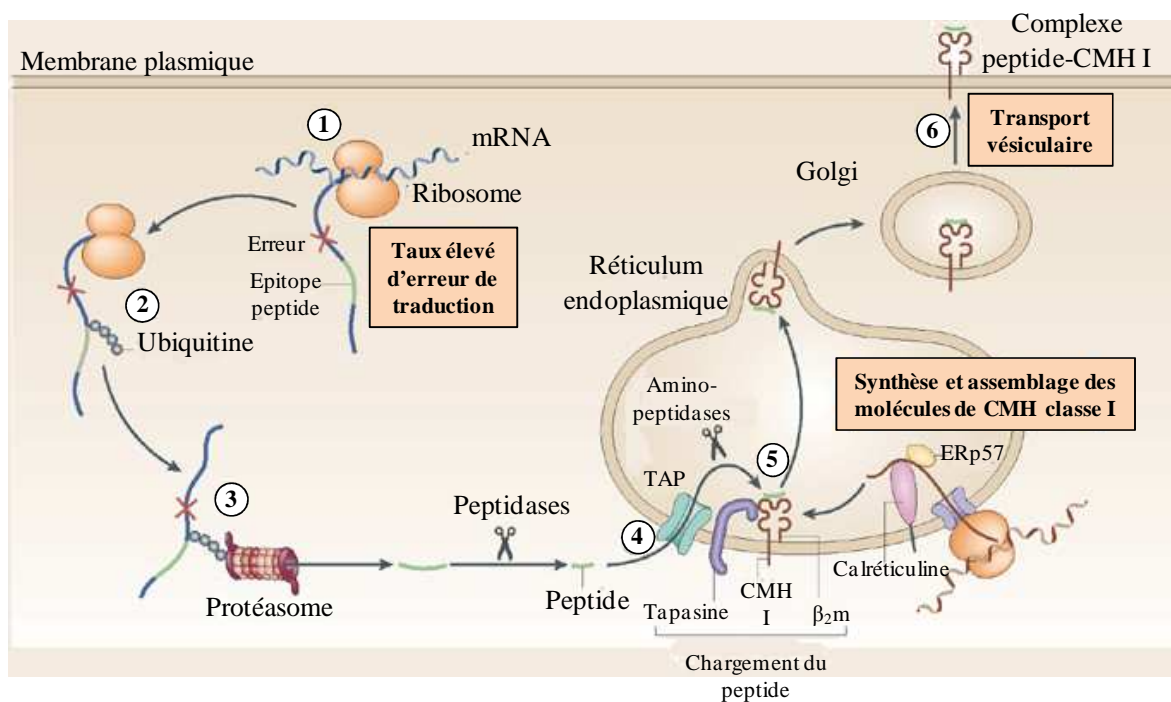


Figure 3: Apprêtement des antigènes endogènes par les molécules du CMH de classe I (Vyas, Van der Veen et al. 2008)

6.2.2 Apprêtement des antigènes exogènes

Les antigènes exogènes proviennent de l'environnement extracellulaire. Il peut s'agir de protéines d'origine bactérienne ou virale, de cellules apoptotiques ou nécrotiques ou encore de complexes immuns (Adams, O'Neill et al. 2005). Les antigènes exogènes sont internalisés

dans les vésicules endosomiales où le pH acide facilite leur dégradation en peptides de 13 à 24 acides aminés par diverses protéases telles que les cathepsines B ou D. Ces antigènes sont présentés par les molécules du CMH de classe II qui sont des hétérodimères formés de deux chaînes glycoprotéiques α et β synthétisées dans le réticulum endoplasmique (**Figure 4**). Les complexes α/β s'associent avec la chaîne invariante Ii qui permet la bonne conformation du complexe et empêche la fixation de peptides endogènes présents au sein du réticulum endoplasmique dans la cavité (« poche à peptide ») formée par les dimères α/β . Le complexe α/β -Ii est ensuite dirigé vers les endosomes via l'appareil de Golgi. Le pH acide permet la dégradation de la chaîne invariante Ii par la cathepsine S : seul un fragment de cette chaîne appelée CLIP (Class II associated invariant chain peptide) demeure au niveau de la « poche à peptide ». Les molécules HLA-DM et HLA-DO vont ensuite permettre la dissociation de CLIP et le chargement du peptide généré à partir de la protéine exogène. Le complexe CMH II / peptide est alors transporté vers la membrane plasmique de la cellule dendritique où il pourra être présenté aux lymphocytes T CD4⁺ (Chow, Toomre et al. 2002; Guermonprez, Valladeau et al. 2002).

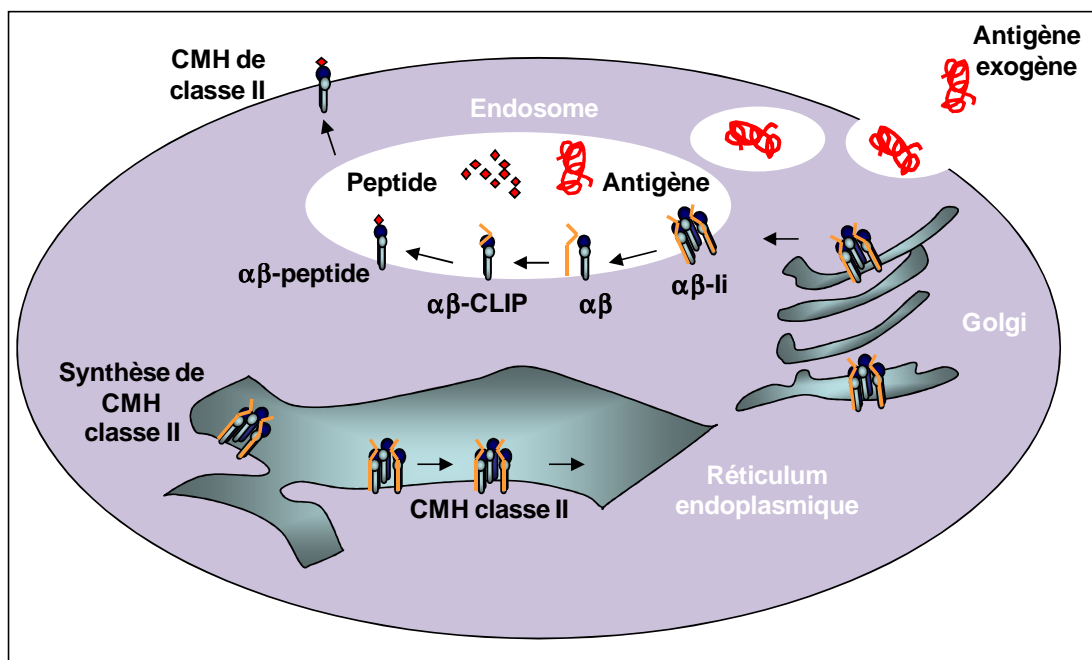


Figure 4: Apprêtement des antigènes exogènes par les molécules du CMH de classe II (Heath and Carbone 2001)

6.2.3 Présentation croisée

Les cellules dendritiques ont la capacité de pouvoir présenter les antigènes exogènes par le CMH de classe I : ce phénomène est appelé « *cross-presentation* » ou « présentation croisée ». Le chargement des peptides issus de protéines exogènes sur la molécule du CMH de classe I a lieu dans des compartiments hybrides « réticulum endoplasmique – phagosome » contenant des molécules du CMH de classe I nouvellement synthétisées. Les antigènes exogènes sont transportés vers le cytosol grâce à un pore formé par le complexe Sec61 où ils sont dégradés par le protéasome. L'hétérodimère TAP transporterait alors les peptides dérivés de ces antigènes du cytosol vers le compartiment hybride puis ces peptides seraient chargés sur les molécules du CMH de classe I grâce à la calréticuline et à la calnexine (Guernonprez, Saveanu et al. 2003; Ackerman and Cresswell 2004; Heath, Belz et al. 2004). La présentation croisée permet aux cellules dendritiques d'induire une réponse immunitaire cytotoxique contre un virus ou un parasite sans que ces cellules ne soient infectées (Guernonprez and Amigorena 2005).

6.3 Migration des cellules dendritiques

La fonction des DC est fortement influencée par leur localisation ainsi que par leur capacité migratoire. Les DC tissulaires, comme celles de la peau, doivent d'abord se détacher de la matrice extracellulaire avant de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires. Ce processus est régulé par l'expression par les DC de la peau de métalloprotéases matricielles, MMP-9 et MMP-2 entre autres (Ratzinger, Stoitzner et al. 2002). La migration des DC en général est dictée en majorité par les chimiokines. Il s'agit de molécules de petite taille impliquées dans le chimiotactisme des leucocytes. Elles déterminent le type de cellules qui doivent traverser l'endothélium et l'endroit où elles doivent se situer dans le tissu. Les chimiokines agissent par l'intermédiaire de récepteurs qui sont des protéines à sept domaines transmembranaires et associés aux petites protéines G qui mènent à la signalisation intracellulaire (McColl 2002). Différents récepteurs de chimiokines sont impliqués dans les stades de la vie d'une cellule dendritique et les changements d'expression de ces récepteurs gouvernent la capacité migratoire des DC. Par exemple, le CCR5 semble permettre le recrutement des cellules dendritiques sur le site d'inflammation *via* les chimiokines CCL3 ou MIP-1 α (Sallusto, Lenig et al. 1998; Aliberti, Reis e Sousa et al. 2000) et le CCR6 apparaît comme important dans le positionnement des DC à la surface des épithélia (Cook, Prosser et al. 2000; Vanbervliet, Homey et al. 2002). Pendant la maturation des cellules dendritiques,

l'expression des récepteurs de chimiokines est modifiée avec la diminution d'expression de CCR5 et l'acquisition de l'expression de CCR7, molécule clé de la migration des DC matures. Cette modification entraîne une attraction de ces cellules vers les organes lymphoïdes secondaires où les ligands CCL21 et CCL19 sont exprimés (Dieu, Vanbervliet et al. 1998; Sozzani 2005; Lukacs-Kornek, Engel et al. 2008).

II. IMMUNOLOGIE DE GREFFE

La transplantation d'organe allogénique est trop récente (une soixantaine d'années) pour que le système immunitaire ait développé un autre système de défense que celui déjà en place pour lutter contre les infections déjà présentes. Nous avons vu précédemment que la réponse immune adaptative implique que les cellules présentatrices d'antigène, en particulier les cellules dendritiques, signalent la présence d'invasion par des pathogènes aux lymphocytes T capables de recevoir ce signal, engendrant ainsi une réponse immune efficace. Au centre de ce dialogue entre la CPA et la cellule T, il y a les molécules codées par le complexe majeur d'histocompatibilité que nous avons vues dans la figure 6. Le degré élevé de polymorphisme de ces molécules au sein d'une espèce et le nombre conséquent de gènes exprimés (au moins 12 par cellule) entraîne un nombre très élevé de combinaisons. Ceci explique le fait que l'identité du CMH entre deux individus soit un phénomène très rare dans l'espèce humaine.

L'allorecognition, base de l'alloréactivité réfère au phénomène par lequel le système immunitaire reconnaît les antigènes spécifiques du donneur d'organe. La réponse immune du receveur contre l'allogreffe a pour cible principale les antigènes du CMH du donneur.

L'alloréactivité présente 3 caractéristiques par rapport à la réponse immune induite par des antigènes conventionnels : aucune présensibilisation n'est nécessaire pour observer la réponse, la réponse est puissante *in vivo* et *in vitro* en raison d'une grande fréquence des précurseurs et enfin la reconnaissance peut se faire sans restriction au CMH du Soi. La reconnaissance de ces antigènes est l'événement primaire le plus important qui conduit au rejet de l'allogreffe. Le rejet de greffe peut être classé cliniquement en distinguant le rejet hyperaigu, le rejet aigu et le rejet chronique. Encore aujourd'hui, malgré les progrès dans le domaine de l'immunosuppression, de nombreux organes sont perdus à cause d'un rejet chronique. Les principales cibles de la réponse immune au cours de l'allogreffe sont les molécules du CMH elles-mêmes et la reconnaissance du CMH allogénique par les cellules T constitue l'événement central qui initie le rejet (Steinmuller 1985; Krensky, Weiss et al. 1990).

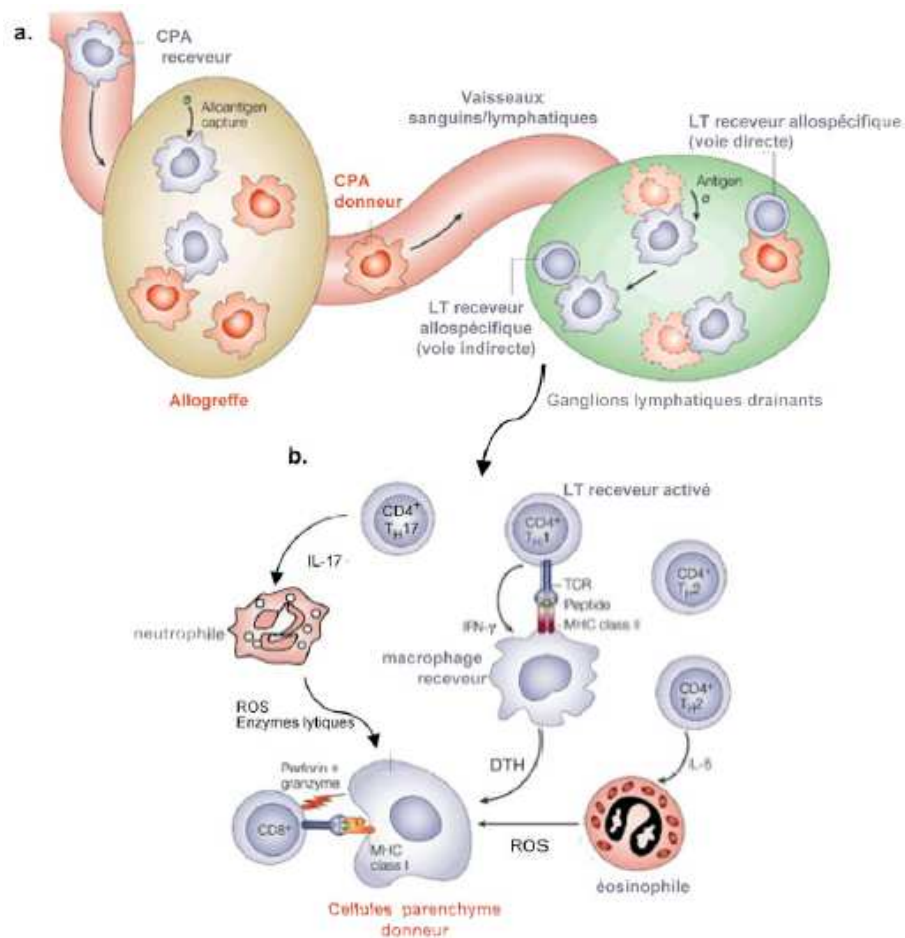


Figure 5 : Mécanismes cellulaires de l'alloréactivité **a.** Les CPA du receveur infiltrant le greffon ainsi que les CPA du donneur vont migrer vers les ganglions lymphatiques où elles vont activer les lymphocytes T par les différentes voies reconnaissances. **b.** Les lymphocytes T CD4 activés vont aider les lymphocytes T CD8 cytotoxiques et peuvent aussi provoquer une réaction d'hypersensibilité retardée (DTH) médiée par les macrophages activés par la sécrétion d'IFN- γ . Les lymphocytes T CD4 peuvent aussi entraîner la lyse directe via FasL. L'inflammation induite par les éosinophiles, conséquence d'une réponse de type Th2, va aussi endommager le greffon. Les lymphocytes Th17 vont recruter les neutrophiles qui vont sécréter des radicaux libres oxygénés et des enzymes lytiques. (Adapté de (Lechler, Garden et al. 2003))

Au début des années 1980, Lechler et Batchelor furent les premiers à proposer l'existence de deux voies distinctes de reconnaissance des allo-antigènes par les cellules T (Lechler and Batchelor 1982; Lechler and Batchelor 1982): la voie directe et la voie indirecte. La voie directe de présentation implique la présentation d'antigène intact du donneur par les cellules présentatrices d'antigène du donneur aux cellules T du receveur. La voie de reconnaissance indirecte est la plus représentative de la réponse à l'antigène classique. Dans cette voie, les cellules T reconnaissent l'antigène du donneur qui ont été apprêtés et présentés

dans le contexte du CMH du Soi sur les CPA du receveur (Sayegh, Perico et al. 1994). Les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ peuvent médier aussi bien les deux types de présentation. Suite à l'alloreconnaissance par l'hôte, la réaction contre le greffon qui en résulte mène, en absence de traitement, à la destruction du tissu du donneur. Une troisième voie nommée présentation semi-directe récemment décrite (Jiang, Herrera et al. 2004; Afzali, Lechler et al. 2007) vient compléter la classification initiale et consiste en la présentation par des molécules de CMH du donneur exprimées à la surface des CPA du receveur.

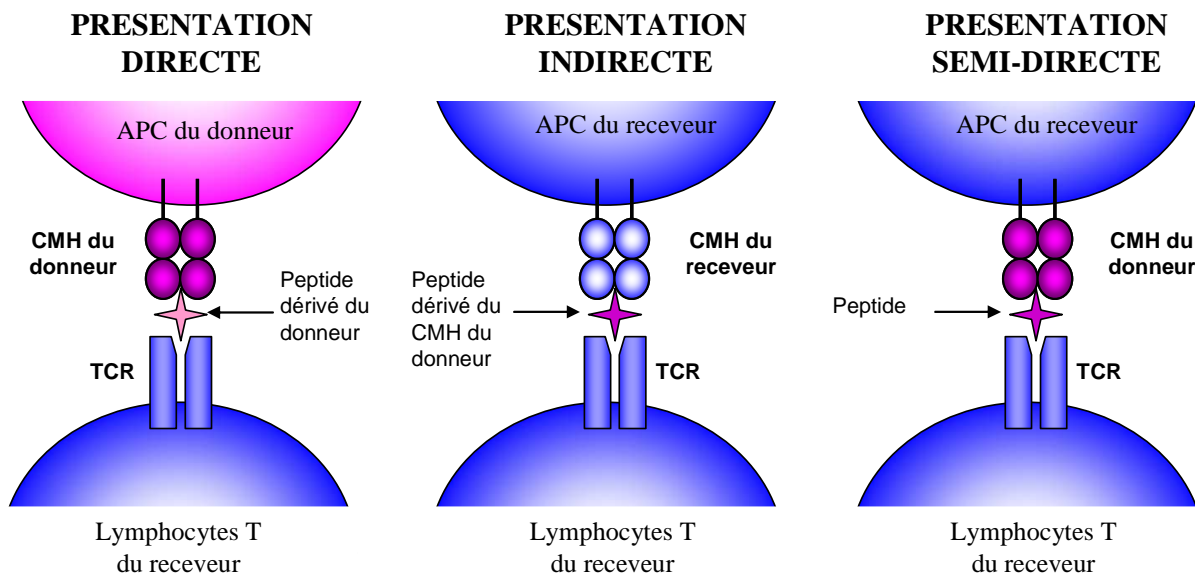


Figure 6 : Les différentes voies d'alloreconnaissance

1. Les différentes voies d'alloreconnaissance

1.1 La voie de présentation directe

Le système immunitaire s'est développé initialement pour combattre des peptides microbiens présentés par des molécules CMH du soi. Or, il existe une forte réponse induite contre l'allogreffe en transplantation. Les cellules T reconnaissent des molécules CMH intactes du donneur sur des cellules présentatrices du donneur, c'est la présentation directe (Larsen, Steinman et al. 1990). La reconnaissance directe se fait au niveau des organes lymphoïdes secondaires par les cellules dendritiques du donneur présentes au niveau du greffon et qui ont migré. En effet, il est possible que le greffon soit « immunologiquement »

ignoré lorsque les animaux sont déficients en organes lymphoïdes secondaires (Lakkis, Arakelov et al. 2000). A ce niveau, les cellules dendritiques du donneur présentent les antigènes du donneur aux cellules T du receveur *via* des molécules du complexe CMH (**Figure 6**). La forte réponse déclenchée par la présentation directe est due à une fréquence élevée de cellules T avec une allospécificité directe (Lindahl and Wilson 1977).

L'alloréactivité représente la reconnaissance du polymorphisme allélique des molécules allogéniques du CMH. L'alloréactivité est due à une réactivité croisée ; un TCR spécifique d'un complexe CMH-peptide du Soi peut également reconnaître une molécule du complexe CMH-peptide allogénique. Bien que la rencontre d'un CMH allogénique apparaisse très peu probable au cours de la vie normale d'un individu, la réponse immune envers les molécules du CMH allogéniques est très forte. De plus, cette reconnaissance directe n'obéit pas aux lois conventionnelles de restriction au CMH. Bien que le répertoire lymphocytaire T soit sélectionné dans le thymus sur la base d'une affinité du TCR suffisante pour les complexes CMH autologue/peptide du Soi, la fréquence des lymphocytes T capables de reconnaître par la voie directe des molécules du CMH vis-à-vis desquelles elles n'ont pas été « éduquées » est paradoxalement très élevée. Il est en effet estimé que 0,1 à 10 % du répertoire T d'un individu est capable de reconnaître des alloantigènes (Benichou, Malloy et al. 1998; Wang, Sviland et al. 1998), tandis que la fréquence des cellules T spécifiques d'un peptide antigénique conventionnel donné, d'origine infectieuse par exemple, est de moins de 1 sur 100 000 (Karulin, Hesse et al. 2000). Cette fréquence élevée des lymphocytes T alloréactifs explique en partie l'intensité particulière de la réponse allogénique directe *in vivo* en dehors de toute sensibilisation préalable.

Cette reconnaissance directe intervient puissamment dans les jours ou les semaines qui suivent la greffe et est responsable des rejets aigus précoces (Benichou 1999). Les cellules dendritiques du donneur ayant une durée de vie limitée, leur part dans l'activation directe diminue petit à petit. Cependant, des données récentes suggèrent que cette voie directe pourrait être active tout au long de la vie des greffons via la présentation par d'autres cellules (endothélium, épithélium) (Bestard, Nickel et al. 2008).

1.2 La voie de présentation indirecte

Lechler & Batchelor (Lechler and Batchelor 1982) ont initialement émis l'hypothèse que les cellules T alloréactives peuvent également être stimulées par la voie indirecte, dans laquelle les antigènes dérivés du donneur sont apprêtés et présentés aux lymphocytes T du receveur par les CPA du donneur (Benichou, Takizawa et al. 1992; Benichou, Fedoseyeva et al. 1994) (**Figure 6**). Ces dernières infiltrent le greffon tout spécialement lors du processus inflammatoire local initié par la transplantation. Elles vont localement phagocyter, apprêter puis migrer et présenter les alloantigènes (la possibilité d'une présentation efficace dans le greffon n'est pas encore totalement exclue dans la mesure où les reins en rejet chronique ont certains aspects qui les rapprochent des organes lymphoïdes secondaires). Ainsi, les CPA du receveur vont présenter des peptides dérivés essentiellement du CMH du donneur *via* leur propre CMH aux cellules T du receveur. De plus, il a été rapporté que les molécules du système HLA solubles et intactes sont présentes dans la circulation chez l'homme après transplantation (Suciu-Foca, Reed et al. 1991), par conséquent, des fragments de molécules du CMH du donneur peuvent être clivés et pris en charge par les DC de l'hôte et présentés par le CMH du Soi comme peptides allogéniques aux lymphocytes T.

La plupart des peptides antigéniques présentés par la voie indirecte proviennent de la région polymorphe des molécules du CMH du donneur (Benichou, Takizawa et al. 1992; Benichou, Fedoseyeva et al. 1994; Gould and Auchincloss 1999). Cependant, la présentation indirecte peut également se produire en réponse à des peptides dérivés d'autres protéines du donneur incluant les antigènes mineurs de transplantation (Richards, Dalheimer et al. 2004).

Les lymphocytes T CD4⁺ sont « classiquement » activés par une voie indirecte puisque les antigènes exogènes rejoignent le circuit de présentation antigénique des molécules HLA de classe II. Le phénomène de présentation croisée est une propriété particulière des cellules dendritiques qui permet aux alloantigènes internalisés de rejoindre la voie d'apprêtement des molécules HLA de classe I, et donc l'activation de lymphocytes T CD8⁺ par la voie indirecte (Popov, Fedoseyeva et al. 1995; Shen and Rock 2006). De tels lymphocytes CD8⁺ ont pu être isolés dans des modèles expérimentaux et aussi chez des patients transplantés.

Alors que la voie directe est plus importante dans le processus de rejet aigu d'allogreffe, la voie de présentation indirecte pourrait jouer un rôle dominant dans le rejet chronique mais ceci reste à prouver. Des analyses des ganglions lymphatiques ont démontré que plus de 90% des cellules T allospécifiques étaient sensibilisés par la voie directe alors que

seulement 1-5% représentent des cellules T allospécifiques de la voie indirecte (Lindahl and Wilson 1977; Benichou, Valujskikh et al. 1999; Suchin, Langmuir et al. 2001). Cependant, un afflux continu d'antigènes du donneur apprêtés par les CPA du receveur augmente le nombre de lymphocytes T alloréactifs de la voie indirecte. Ces lymphocytes T semblent aussi plus résistants à l'immunosuppression conventionnelle (Sawyer, Dalchau et al. 1993).

1.3 La voie de présentation semi-directe

Ce modèle de reconnaissance propose que des molécules intactes du CMH allogénique soient capturées par les CPA du receveur à partir du greffon et a été démontré par Lechler et collaborateurs, tout d'abord dans des travaux *in vitro* (**Figure 6**). Des phénomènes de transfert de molécules du CMH par acquisition de fragments de membrane cellulaire ont été observés entre des cellules endothéliales et des DC (Jiang, Herrera et al. 2004), et également entre DC par l'intermédiaire des exosomes (Thery, Duban et al. 2002). Par ailleurs, les DC du donneur semblent sécréter des exosomes contenant les molécules du CMH qui pourraient fusionner au contact de la membrane des cellules dendritiques du receveur (Jiang, Herrera et al. 2004). L'acquisition de molécules du CMH allogénique pourrait survenir lors de la circulation des DC du receveur au travers du greffon et à partir de l'endothélium vasculaire. Les DC du receveur exprimeraient donc les molécules à la fois du CMH autologue et du CMH allogénique, et seraient capables d'activer simultanément la réponse CD4 et CD8 par les voies directe et indirecte.

2. Les différents types de rejet

2.1 Le rejet hyperaigu

Le rejet hyperaigu survient rapidement après la greffe (en moins de 24h) et est principalement dû aux anticorps présents dans le sérum de l'hôte, anticorps spécifiques du greffon. Ainsi, les IgM vont reconnaître des antigènes portés par les cellules endothéliales, entraînant la destruction de celles-ci. Les complexes antigène-anticorps entraînent également un phénomène de coagulation à l'intérieur des vaisseaux. La cascade du complément peut aboutir à la destruction de l'endothélium ou, lorsque la lésion est grave sans être fatale, à l'activation des cellules endothéliales. La prévention du rejet hyperaigu s'effectue par l'assurance de la compatibilité du système ABO ainsi que par un test de compatibilité

(« cross-match ») entre le donneur et le receveur. Ce test consiste en l'incubation des lymphocytes du donneur avec le sérum du receveur en présence de complément. Une mort cellulaire indique la présence d'anticorps contre le donneur et empêche par conséquent la réalisation de la transplantation.

2.2 Le rejet aigu

Le rejet aigu est constaté le plus souvent dans les jours ou les semaines qui suivent la greffe et est causé par l'allorecognition des antigènes du donneur par les lymphocytes T auxiliaires du receveur. Les cellules dendritiques présentes dans le greffon migrent vers les ganglions lymphatiques et stimulent une réponse immunitaire allogénique primaire. Les cellules T ainsi activées migrent vers le greffon et endommagent le tissu par différents mécanismes effecteurs. Le mécanisme essentiel du rejet aigu cellulaire est une infiltration massive du greffon par des cellules mononuclées comme les macrophages et les lymphocytes T du receveur (**Figure 7**).

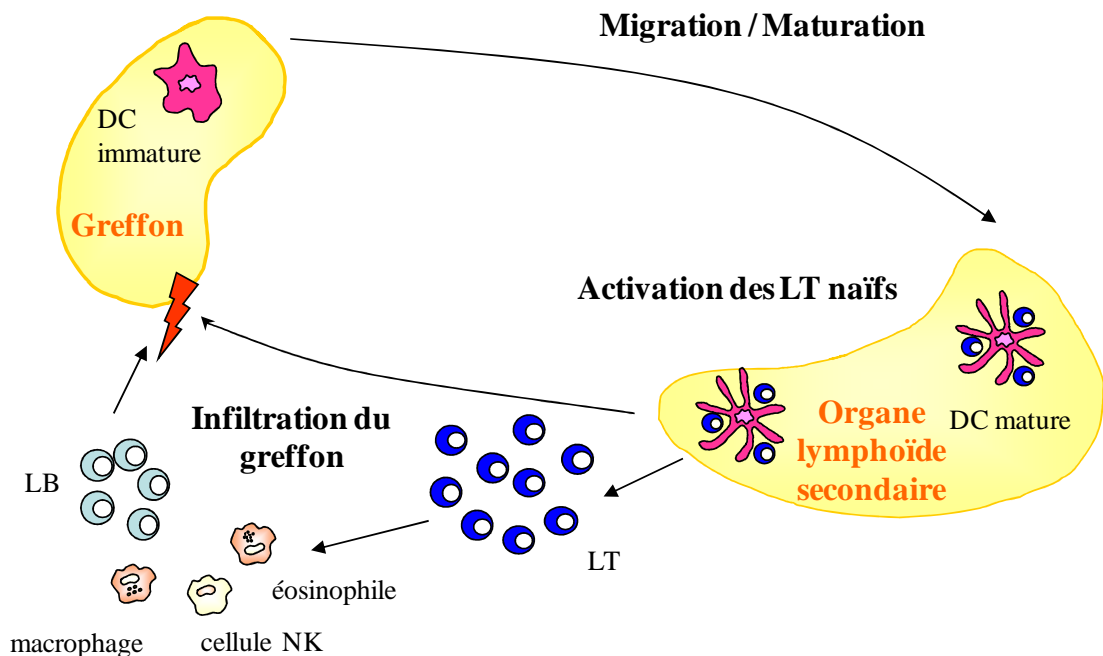


Figure 7 : Modèle de rejet aigu

Cette infiltration s'accompagne de la génération de cellules T cytotoxiques et par l'induction de réactions d'hypersensibilité retardée. Les anticorps peuvent être également la cause des dommages tissulaires, non seulement par la fixation du complément, mais également par l'intermédiaire de lymphocytes T cytotoxiques (CTL pour *Cytotoxic T Lymphocyte*) ou de cellules tueuses naturelles (NK pour *Natural Killer*), pouvant exercer une cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC pour *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*).

Le rôle essentiel des lymphocytes T CD4⁺ dans le phénomène de rejet s'exerce sur un ensemble de mécanismes lié à la sécrétion de différentes cytokines. L'IFN- γ permet l'activation des lymphocytes T cytotoxiques mais également l'activation des cellules présentatrices d'antigène et les éosinophiles. De plus, il active les macrophages en association avec le TNF- β . L'IL-2 couplée à l'IL-4 et l'IL-5 permet l'activation des cellules B et la synthèse d'anticorps dirigés contre le greffon.

2.3 Le rejet chronique

La séquence d'évènements de rejet de greffe peut être scindée en deux étapes distinctes : tout d'abord la sensibilisation durant laquelle les lymphocytes allo-réactifs prolifèrent après reconnaissance des alloantigènes et une phase effectrice durant laquelle la destruction du greffon par la réponse immune est opérée. Les cellules CD4⁺ allo-réactives stimulées par les molécules de classe II portées par les cellules endothéliales du greffon et les cellules dendritiques activées produisent un ensemble de cytokines (IL-2, IFN- γ , TNF- α) qui stimulent la production d'IL-1 β , de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-8 par les cellules présentatrices d'antigène, les lymphocytes T CD4⁺ Th1 et les lymphocytes T CD8⁺ qui vont à leur tour stimuler le recrutement des cellules de la lignée monocyto/macrophagique. Les lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ vont participer à l'activation des cellules cytotoxiques CD8⁺. Par ailleurs, les cellules Th2 et les DC activées vont stimuler la synthèse d'allo-anticorps dirigés essentiellement contre des antigènes du CMH ou des antigènes MICA qui sont apparentés aux antigènes du CMH. Les cellules T cytotoxiques détruisent les cellules du greffon par reconnaissance des antigènes de classe I, adhérence, synthèse de perforine et lyse de la membrane de la cellule cible, ou bien par induction d'apoptose. En plus de cette réaction spécifique, des cellules tueuses non spécifiques (NK, monocytes, polynucléaires neutrophiles

et éosinophiles) pourraient participer à la lyse des cellules du greffon (**Figure 8**). Les alloanticorps se fixent sur les antigènes du greffon portés par l'endothélium vasculaire et les cellules épithéliales. Ces anticorps contribuent, avec les lymphocytes T, à la formation des lésions vasculaires du greffon observées au cours du rejet chronique.

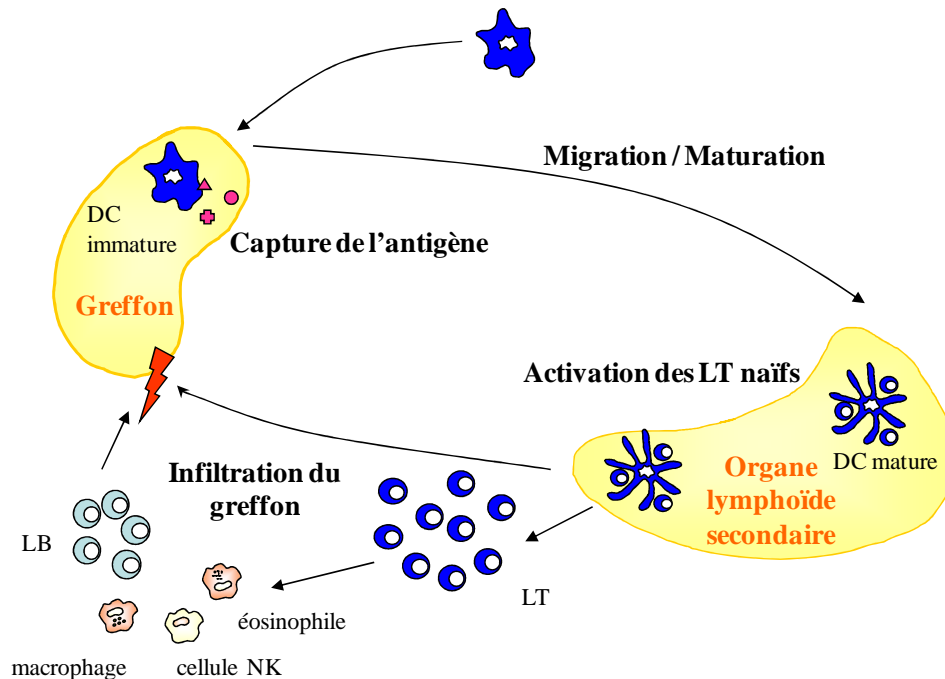


Figure 8 : Modèle de rejet chronique

3. Les immunosuppresseurs

Le succès d'une transplantation d'organe dépend principalement des immunosuppresseurs qui contrôlent la réponse immunitaire allogénique. Parmi ces immunosuppresseurs, la 6-mercaptopurine a été le premier à être découvert en 1959 par Schwartz & Dameshek (Schwartz and Dameshek 1959). Cette molécule a la propriété d'inhiber la prolifération des lymphocytes T et de prolonger le temps de survie du greffon. Les recherches se sont donc intensifiées sur des molécules capables soit de détruire les lymphocytes T du sang périphérique soit de suspendre leur fonction. Ainsi, différents types d'agents immunosuppresseurs ont été développés : des inhibiteurs de la calcineurine (la cyclosporine et le tacrolimus), des inhibiteurs de mTOR (la rapamycine et l'évérolimus), des inhibiteurs du métabolisme des purines et des pyrimidines (l'azathioprine et l'acide mycophénolique), des anti-inflammatoires de la famille des glucocorticoïdes utilisés en tant

qu'immunosuppresseur (dexaméthazone) ainsi que des anticorps monoclonaux (anti-CD3 et anti-CD25) et polyclonaux (ATG-anti-thymoglobulines) (**Figure 9**).

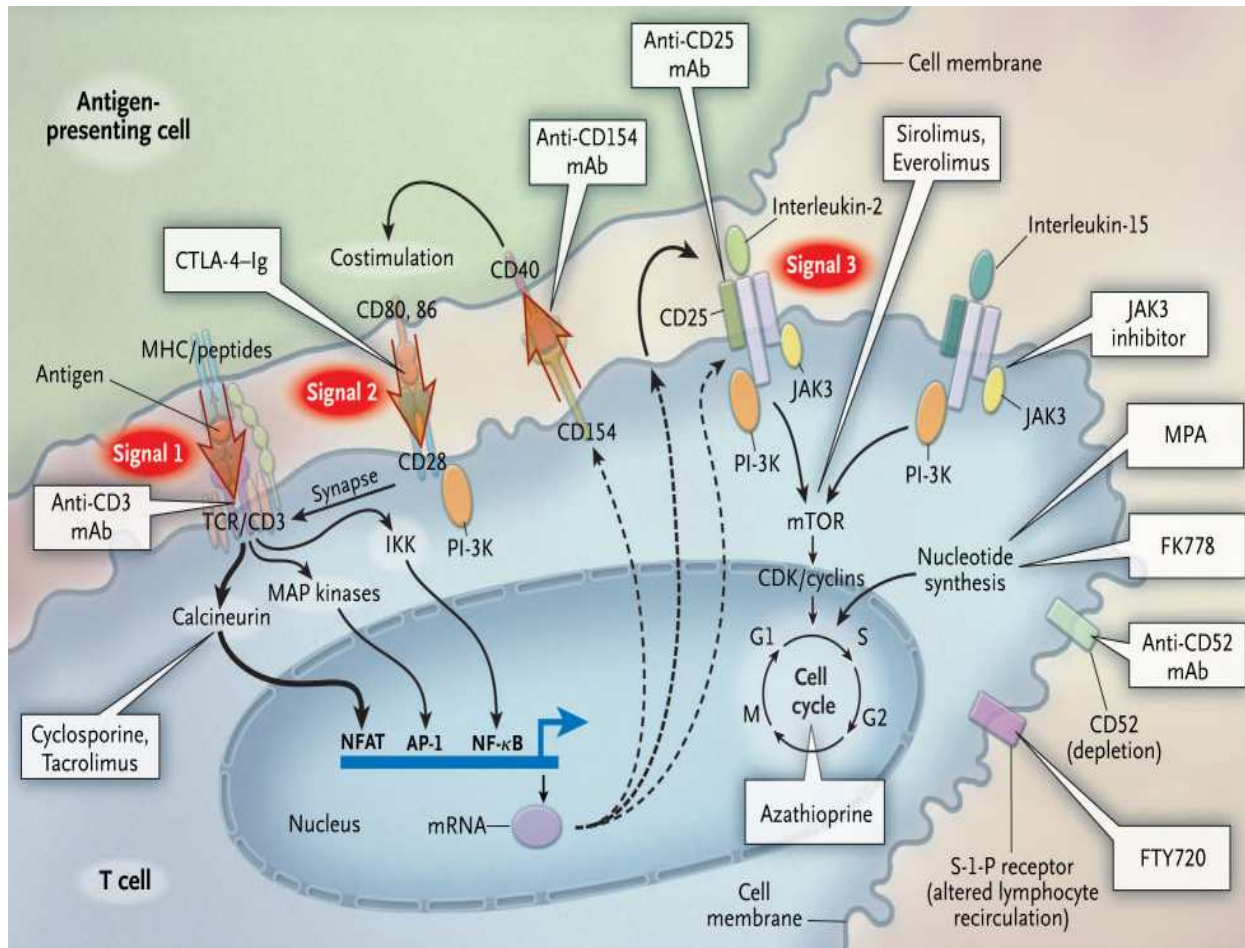


Figure 9 : Sites d'action des différents immunosuppresseurs

D'autres molécules sont en cours d'évaluation dans des essais thérapeutiques en transplantation comme la molécule CTLA-4-Ig (Belatacept®). Il existe également d'autres agents comme des dérivées de la vitamine D₃ qui ont des propriétés immunomodulatrices *in vitro* en cours de développement pour la thérapeutique chez l'homme.

Néanmoins, les immunosuppresseurs n'induisent pas de tolérance immune et dépriment le système immunitaire de façon importante et de manière non spécifique. En conséquence, ils sont à l'origine de nombreux effets secondaires tels que le développement de cancers viro-induits ou d'infections à germes opportunistes d'origine bactérienne, virale et fongique.

3.1 L'acide mycophénolique

Le mycophénolate mofétil (MMF) libère son principe actif appelé acide mycophénolique (MPA) après hydrolyse. Ce dernier est le produit de fermentation du *Penicillium fungus*. Le MPA est un inhibiteur non compétitif et réversible de l'enzyme inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH) nécessaire à la synthèse *de novo* des nucléotides guanosines (Allison and Eugui 2000). Comme les lymphocytes sont incapables d'utiliser la voie de récupération des nucléotides, leur prolifération est particulièrement sensible à l'inhibition de la synthèse *de novo* par le MPA.

Outre ses propriétés immunosuppressives sur les lymphocytes T, le MPA agit également sur d'autres cellules du système immunitaire et en particulier sur les cellules dendritiques. Ce n'est qu'en 2000 que l'action du MPA sur les DC murines a été mise en évidence. Ainsi, Mehling *et al.*, ont montré dans un modèle d'hypersensibilité cutanée chez la souris que le MPA inhibe l'expression de certains marqueurs de maturation et de co-stimulation comme le CD40, le CD80, le CD86 et le CD54, la sécrétion d'IL-12 et que ces DC ont une faible capacité allostimulatrice (Mehling, Grabbe et al. 2000). Par ailleurs, le MPA augmente l'expression de B7-DC, un régulateur négatif de la prolifération lymphocytaire (Geng, Jiang et al. 2006).

Chez l'Homme, l'effet du MPA sur les DC a également été étudié. Ainsi, Colic *et al.* ont mis en évidence que la présence de MPA lors de la différenciation de monocytes en cellules dendritiques induisait l'apoptose des cellules dendritiques immatures humaines et diminuait l'expression de certaines molécules de co-stimulation et d'adhésion comme le CD40, le CD54, le CD80 et le CD86 (Colic, Stojic-Vukanic et al. 2003).

Suite à une maturation induite par le LPS ou le TNF- α , le MPA réduit l'expression des marqueurs de co-stimulation et de maturation comme le CD83, le CD80 et le CD86 (Colic, Stojic-Vukanic et al. 2003). Par ailleurs, cette molécule maintient l'endocytose dépendante au récepteur au mannose (Lagaraine, Hoarau et al. 2005; Dubsky, Friedl et al. 2006) mais diminue l'expression du CD205 associée à la capture antigénique (Wadia, Herrera et al. 2009). Néanmoins, ces cellules expriment des récepteurs aux chimiokines caractéristiques des cellules dendritiques matures tels que CCR7 et CXCR4. Ainsi, le MPA inhibe la maturation phénotypique des cellules dendritiques mais conserve leur capacité de migration vers les organes lymphoïdes secondaires.

Le MPA réduit la synthèse d'IL-12 mais augmente la sécrétion d'IL-10 après une stimulation par le TNF- α (Lagaraine, Hoarau et al. 2005). Par contre, il réduit à la fois la

production d'IL-12, d'IL-10, d'IL-18 et de TNF- α suite à une activation par le LPS (Colic, Stojic-Vukanic et al. 2003). Enfin, le MPA induit des cellules dendritiques ayant une faible capacité allo-stimulatrice (Colic, Stojic-Vukanic et al. 2003; Lagaraine, Hoarau et al. 2005; Wadia, Herrera et al. 2009).

Le fait que les propriétés immunomodulatrices du MPA sur la cellule dendritique soient liées à sa capacité à bloquer l'IMPDH reste controversé. En effet, l'ajout de dbGMP ou d'un inhibiteur de l'AMPc n'inhibe pas l'effet inhibiteur du MPA sur la prolifération lymphocytaire (Lagaraine, Hoarau et al. 2005). Par contre, la guanosine exogène lève l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T induite par des cellules dendritiques maturées en présence de MPA (Dubsky, Friedl et al. 2006). De plus, le MPA induit une diminution de la quantité de GTP lors de la différenciation de monocytes en cellules dendritiques et lors de leur maturation. L'ensemble de ces données sous-entend que l'effet du MPA sur les cellules dendritiques pourrait passer en partie par son action inhibitrice sur l'enzyme IMPDH dans la cellule dendritique. Les DC traitées au MPA semblent avoir un profil dit « tolérogène ».

3.2 La rapamycine

La rapamycine est un antibiotique macrolide produit par le *Streptomyces hydroscopicus* (Abraham and Wiederrecht 1996), découvert sur l'île de Pâques (Rapa Nui). Durant le développement clinique de cette molécule, la mise en évidence d'effets anti-prolifératifs a orienté son utilisation comme agent immunosuppresseur dans la prévention des rejets de greffe. La rapamycine exerce sa fonction en se liant au complexe mTOR-FKBP12 («FK506-binding protein 12») entraînant l'inhibition de l'activité kinase de mTOR (Sabers, Martin et al. 1995). La protéine mTOR est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire au travers de : l'initiation, la traduction, la synthèse de protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire et la synthèse d'ADN. Son action passe par le blocage de signaux intracellulaires induits par la liaison de l'IL-2 à son récepteur mais la rapamycine n'inhibe pas l'expression du gène de l'IL-2 ni celle de son récepteur (Dumont, Melino et al. 1990). Ainsi, la rapamycine intervient à une étape un peu plus tardive de l'activation des lymphocytes T. En effet, elle bloque leur prolifération et leur survie cellulaire induite par l'IL-2 (Terada, Lucas et al. 1993; Morelon, Mamzer-Bruneel et al. 2001).

L'influence de cet agent sur les fonctions de la cellule dendritique n'a été décrite que dans les années 2000. Cependant son rôle sur les DC est encore mal défini. En effet, de nombreux changements sont observés quant à la capture et la présentation antigéniques par les cellules présentatrices d'antigène (APC) lorsqu'elles sont différenciées en présence de rapamycine. Ainsi, la rapamycine inhibe la phagocytose, l'endocytose et la pinocytose, diminue l'expression des récepteurs de la capture antigénique tels que CD46, CD91, CD32 et le récepteur au mannose et les molécules de CMH de classes I et II. De plus, la présentation croisée des antigènes exogènes par les molécules du CMH de classe I ne semble pas affectée. La rapamycine facilite également l'autophagie et peut influencer la présentation des antigènes du soi (Thomson, Turnquist et al. 2009) (**Figure 10**).

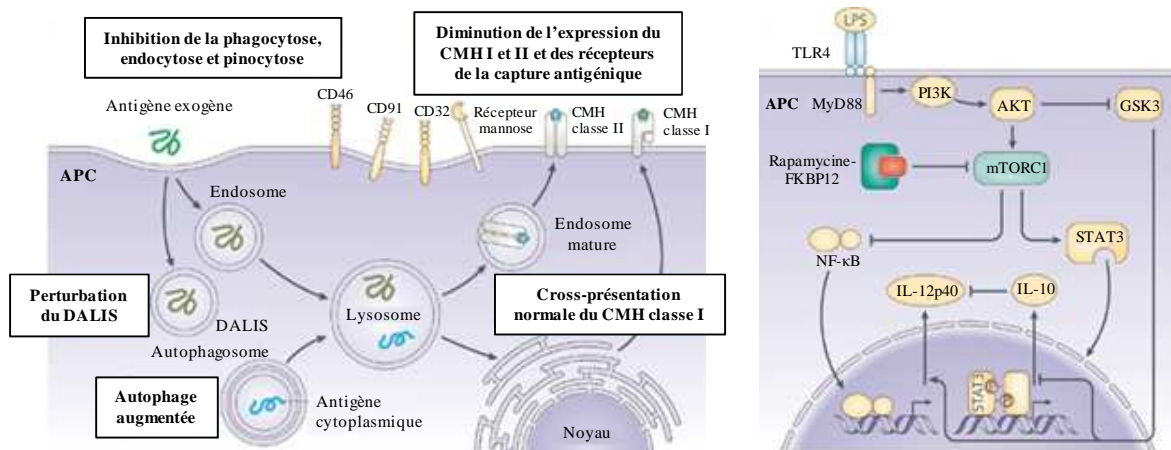


Figure 10 : mTOR et la rapamycine régulent la fonction des APC (d'après Thomson, Turnquist et al. 2009)

Cependant, les différents travaux montrent des divergences sur les effets de la rapamycine au moment de la maturation. Par exemple, selon Chiang *et al.*, et Woltman *et al.*, la rapamycine n'interfère pas dans le processus de maturation des DC (Woltman, de Fijter et al. 2001; Chiang, Wang et al. 2004). A l'inverse, d'autres travaux soulignent une inhibition de l'expression des molécules de co-stimulation CD40, CD80, CD86, CD83 et/ou des molécules du CMH de classe II ainsi que des chaînes du récepteur à l'IL-4 (CD124, CD132) par la rapamycine (Hackstein, Taner et al. 2003; Monti, Mercuri et al. 2003; Taner, Hackstein et al. 2005). La rapamycine pourrait donc inhiber la maturation dépendante de l'IL-4 (Hackstein, Taner et al. 2003). Par contre, cette molécule n'altérerait pas la capacité des cellules à présenter les antigènes endogènes par le CMH de classe I et exogènes par le CMH de classe II ni la présentation croisée (Lee, Yang et al. 2005). Curieusement, la rapamycine augmente

l'expression de CCR7 favorisant ainsi la migration des DC vers les ganglions lymphatiques *in vivo* et en réponse à CCL19 *in vitro* (Sordi, Bianchi et al. 2006). En ce qui concerne la synthèse des cytokines, une inhibition de la synthèse d'IL-12 et d'IL-10 est observée après une stimulation par le CD40L en présence de rapamycine (Monti, Mercurio et al. 2003) mais l'inhibition de la sécrétion d'IL-12 n'est pas retrouvée suite à une activation par le LPS (Chiang, Wang et al. 2004). Par ailleurs, les cellules dendritiques traitées par la rapamycine sont incapables d'activer efficacement les lymphocytes T allogéniques *in vitro* et *in vivo* (Hackstein, Taner et al. 2003; Monti, Mercurio et al. 2003; Taner, Hackstein et al. 2005). La rapamycine semble aussi inhiber l'orientation Th1 en diminuant la sécrétion d'IFN- γ par les lymphocytes T (Chiang, Wang et al. 2002; Monti, Mercurio et al. 2003; Taner, Hackstein et al. 2005).

A l'opposé, une étude récente de Weichhart *et al.*, suggère que la rapamycine augmente la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-12 et IFN- γ , diminue la synthèse d'IL-10 et augmente la capacité d'allostimulation des DC (Weichhart, Costantino et al. 2008).

Chez la souris, les cellules dendritiques traitées à la rapamycine sont de faibles stimulateurs des lymphocytes T CD4⁺ mais enrichissent en lymphocytes T régulateurs antigène-spécifiques promouvant ainsi la tolérance d'allogreffe (Turnquist, Raimondi et al. 2007). La rapamycine est également responsable de l'expansion des lymphocytes T CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ naturels murins (Battaglia, Stabilini et al. 2005). Enfin, l'injection de cellules dendritiques traitées par la rapamycine pulsées avec des allo-antigènes avant la greffe prolonge la survie d'allogreffes cardiaques (Chiang, Wang et al. 2004) et cutanées de souris (Horibe, Sacks et al. 2008).

3.3 Les Glucocorticoïdes

Les effets des glucocorticoïdes sur les lymphocytes sont principalement liés à l'inhibition de la sécrétion des cytokines. En effet, le complexe corticoïde/récepteur se fixe sur des séquences régulatrices, situées dans les promoteurs de gènes et appelées éléments de réponse aux glucocorticoïdes, et peut ainsi moduler la transcription des gènes concernés, notamment ceux codant l'IL-2, l'IL-6, l'IFN- γ et le TNF- α (Almawi, Beyhum et al. 1996). De plus, les glucocorticoïdes peuvent également avoir un impact sur l'expression de gènes ne possédant pas d'éléments de réponse aux glucocorticoïdes, vraisemblablement en bloquant la

translocation vers le noyau d'importants facteurs de transcription (Almawi, Beyhum et al. 1996).

3.4 Les anti-Calcineurines

L'activation des LT par les antigènes du donneur entraîne un signal calcique qui active une phosphatase, la calcineurine. Cette dernière permet la déphosphorylation de NFAT, un facteur de transcription, qui va entrer dans le noyau pour activer la synthèse de cytokines proinflammatoires (Shibasaki, Hallin et al. 2002). Les anti-calcineurines, couplés à une protéine intracellulaire appelée immunophiline, inhibent l'activité de la phosphatase et donc la synthèse des cytokines, bloquant l'activation et l'activation des lymphocytes T (Taylor, Watson et al. 2005). La cyclosporine A et le tacrolimus sont les 2 principaux anti-calcineurines utilisés en transplantation.

3.5 L'Azathioprine

L'azathioprine est un immunosuppresseur cytostatique dont le principe actif, la 6-mercaptopurine, est libéré après hydrolyse. L'azathioprine est une forme de 6-mercaptopurine moins toxique que la 6-mercaptopurine pure. En tant qu'analogue des purines, cette dernière inhibe la synthèse d'ADN par antagonisme des bases puriques et a donc un effet antiprolifératif, notamment sur les lymphocytes (Taylor, Watson et al. 2005).

3.6 Les anticorps anti-lymphocytaires

Les anticorps anti-lymphocytaires ciblent spécifiquement les lymphocytes et sont majoritairement utilisés en traitement d'induction. Il existe 2 grands types d'anticorps antilymphocytaires utilisés en transplantation d'organe : les polyclonaux et les monoclonaux. Les premiers sont un mélange d'anticorps ciblant de nombreuses molécules de surface des lymphocytes et obtenus en inoculant des lapins ou des chevaux avec des cellules humaines. Ils induisent généralement une déplétion lymphocytaire périphérique, probablement par une réaction complément-dépendante (Taylor, Watson et al. 2005). L'exemple le plus utilisé en transplantation rénale est l'ATG.

Les seconds ciblent spécifiquement un épitope d'une molécule de surface. Ils agissent suivant divers mécanismes : déplétion complément-dépendante, modulation de l'expression de surface de la molécule ciblée, ou encore blocage de l'interaction avec le ligand de cette molécule (Taylor, Watson et al. 2005). Les anticorps monoclonaux sont de plus en plus utilisés, notamment parce que leur cible est mieux définie et qu'ils sont élaborés pour limiter la réponse immune inter-espèce. L'anticorps anti-IL-2R, qui reconnaît un épitope de la sous-unité α du récepteur à l'IL-2 (CD25), est le plus couramment utilisé.

4. La tolérance immune

4.1 Les mécanismes généraux

La mise en place d'une réponse immunitaire effectrice est nécessaire afin de défendre l'organisme vis-à-vis des pathogènes et des virus. Néanmoins, cette réponse immunitaire doit être contrôlée afin de ne pas être exacerbée et prendre fin lorsque le pathogène a disparu. Par ailleurs, notre système immunitaire ne doit pas générer de réponse effectrice envers le Soi, sous peine de déclencher une maladie auto-immune. Malgré la sélection négative des lymphocytes auto-réactifs dans le thymus, qui constitue la tolérance centrale, certaines cellules qui reconnaissent les antigènes du Soi se retrouvent en périphérie. Une régulation de la réponse immunitaire en périphérie est donc indispensable à la fois pour inactiver les cellules T auto-réactives afin d'éviter l'apparition de maladies auto-immunes et pour réguler l'intensité des réponses immunitaires contre le « non Soi ».

La tolérance immune centrale implique la délétion clonale lors du développement des thymocytes tandis que la tolérance périphérique est accomplie par divers mécanismes comme l'anergie, l'induction d'apoptose, l'ignorance et l'action de cellules régulatrices.

4.1.1 La tolérance immune centrale

Le premier mécanisme de tolérance est la tolérance du soi, mécanisme immunologique primordial à la santé de l'individu.

Pour assurer une réponse immune efficace, le système immunitaire doit comporter des cellules T capables de reconnaître et de répondre à un nombre important d'antigènes étrangers (Blackman, Gerhard-Burgert et al. 1990). Pour une large part ceci est réalisé par les multiples

réarrangements des gènes du TCR au cours de l'ontogénie qui aboutit à la production d'une grande variété de spécificités antigéniques. Durant ce processus stochastique, des clones ayant des spécificités pour des antigènes du Soi sont produits. Ces clones doivent être fonctionnellement éliminés pour prévenir l'apparition de maladies auto-immunes.

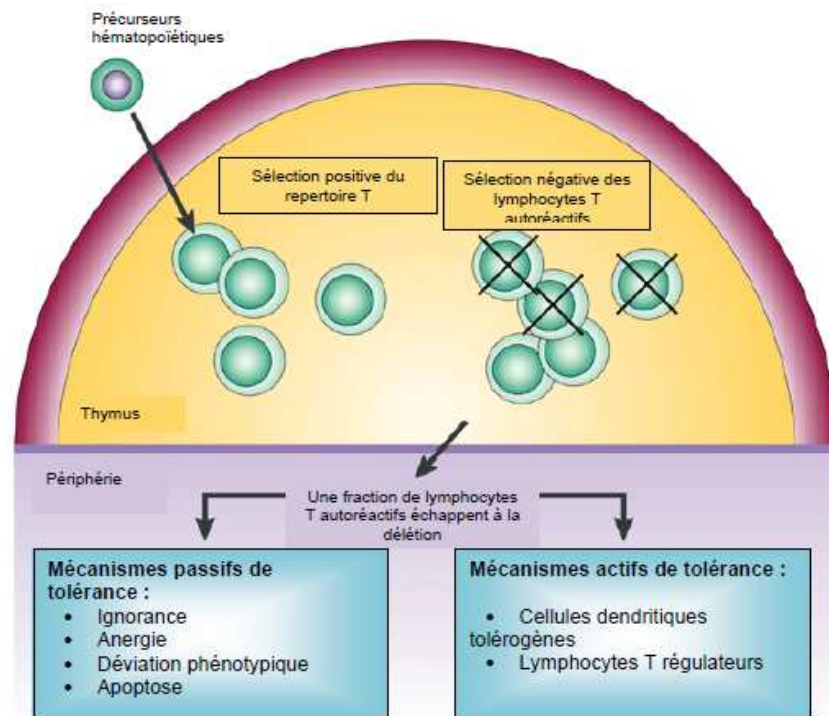


Figure 11 : Les différentes voies de la tolérance immune D'après (Walker and Mannie 2002)

Les progéniteurs des lymphocytes T, provenant de la moelle osseuse, migrent dans le thymus pour y subir une maturation. Au cours de leur développement dans le thymus, les lymphocytes T (ou thymocytes) subissent deux sélections : positive et négative. La sélection positive s'effectue dans la zone corticale du thymus où seuls les lymphocytes T doubles positifs $CD4^+CD8^+$ reconnaissant les molécules de CMH du Soi reçoivent un signal de survie et poursuivent leur développement. Le second phénomène de tri, la sélection négative, aussi connue sous le nom de déletion clonale, s'effectue dans la zone médullaire du thymus (Sprent and Kishimoto 2002). Les lymphocytes T autoréactifs, possédant une forte avidité pour les peptides du Soi présentés par le CMH des cellules présentatrices d'antigènes thymiques (dont les cellules dendritiques), vont mourir par l'induction d'apoptose *via* l'activation de leur TCR (Anderton and Wraith 2002). Environ 3% seulement des précurseurs de cellules T qui entrent

dans le thymus survivent à la sélection positive et négative. Ces lymphocytes quittent le thymus pour se diriger vers les organes lymphoïdes secondaires.

4.1.2 La tolérance immune périphérique

Certains lymphocytes T auto-réactifs échappent à la sélection négative, en particulier les lymphocytes T spécifiques des déterminants du Soi absents du thymus mais présents en périphérie. L'existence d'une tolérance périphérique est donc nécessaire pour inactiver les cellules T autoréactives. Cette tolérance périphérique repose sur plusieurs mécanismes : l'inactivation fonctionnelle des cellules auto-réactives par des cellules régulatrices, l'induction d'apoptose, l'ignorance et enfin l'anergie.

4.1.3 La délétion clonale

La délétion des cellules T peut également avoir lieu en périphérie, lorsque celles-ci rencontrent l'antigène dans des conditions particulières (Kabelitz, Pohl et al. 1993). Par exemple, la mort par apoptose après activation appelée AICD (« Activation-induced Cell Death ») est déclenchée suite à une activation trop importante. Il s'agit d'un mécanisme de contrôle de l'expansion des lymphocytes T lorsqu'ils ont été préalablement stimulés. La stimulation répétée de lymphocytes T par des antigènes spécifiques présents en forte concentration ou des activateurs polyclonaux va entraîner une mort des cellules activées par un phénomène d'apoptose dépendant d'une interaction Fas/FasL (Brunner, Mogil et al. 1995; Marth, Zeitz et al. 1999). Son rôle est avant tout de prévenir une activation incontrôlée des cellules T. Mais ce processus est également important pour le maintien d'une tolérance périphérique à certains antigènes du Soi comme le suggèrent des mutations touchant Fas ou FasL et qui conduisent à des syndromes auto-immuns (Singer, Carrera et al. 1994; Holzelova, Vonarbourg et al. 2004). Il semble donc que des lymphocytes T puissent également subir une délétion clonale en périphérie; c'est notamment le cas des lymphocytes T CD4⁺ reconnaissant les antigènes administrés par voie orale (Bu, Keshavarzian et al. 2001).

4.1.4 L'anergie

L'anergie constitue un état particulier de la cellule T qui est fonctionnellement inactivée c'est à dire qu'elle ne répond plus par une prolifération après stimulation du TCR.

La cellule reste vivante mais est incapable de proliférer et de synthétiser de l'IL-2 (Schwartz 1990). Elle est dans un état d'hypo-réponse, c'est-à-dire qu'elle ne peut plus répondre à une nouvelle stimulation. Il existe deux sortes d'anergie : l'anergie clonale et « l'anergie *in vivo* ».

L'anergie clonale résulte d'une activation du TCR sans signal de co-stimulation via le CD28 (signal 1 sans signal 2) ; elle est réversible en présence de grandes quantités d'IL-2 ou par un signal via Ox40 (Schwartz 2003). « L'anergie *in vivo* » dépend majoritairement des molécules de « co-inhibition » comme CTLA-4 ou PD-1. Cette forme d'anergie nécessite une certaine activation préalable du lymphocyte dans la mesure où CTLA-4 est une molécule inductible. Contrairement à l'anergie clonale, elle n'est pas levée par l'IL-2. Par ailleurs, la présence de l'antigène est nécessaire au maintien de « l'anergie *in vivo* » (Schwartz 2003). Les signaux induits par l'engagement de ces récepteurs ne sont pas clairement connus. Ces récepteurs transduisent des signaux inhibiteurs qui confèrent un état de non réponse à long terme ou bien simplement un changement dans le seuil d'activation.

4.1.5 L'ignorance

L'ignorance est une absence d'activation de la cellule T qui conduit à une relation d'acceptation mutuelle de l'antigène et de la cellule effectrice (Melero, Bach et al. 1997). Des études anciennes avaient montré que des antigènes viraux exprimés sur les cellules des îlots β dans le pancréas étaient incapables de rendre anergiques ou de détruire les lymphocytes effecteurs périphériques, ce qui avait pour résultat une coexistence pacifique entre les antigènes et les cellules effectrices. Celles-ci demeuraient pourtant parfaitement compétentes et étaient capables de réagir *in vitro* à l'antigène (Ohashi, Oehen et al. 1991). Dans un état d'ignorance, les LT certes n'initient pas de réponse immune mais sont incapables d'inhiber l'activité de lymphocytes effecteurs (Miller and Heath 1993). L'ignorance n'est donc pas un mécanisme de tolérance active. Les antigènes séquestrés dans des zones immunologiquement protégées sont également ignorés par le système immunitaire (Barker and Billingham 1977).

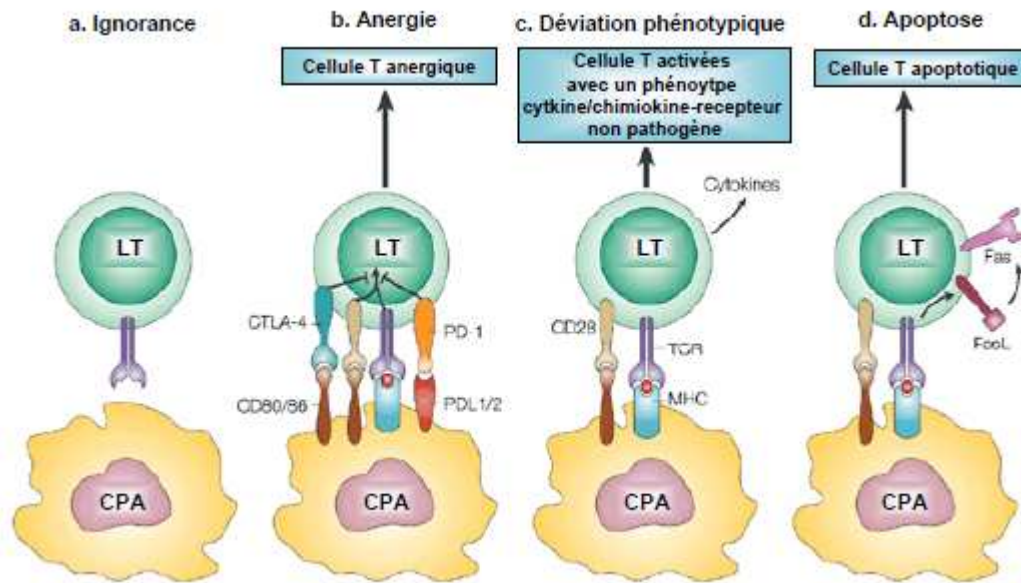


Figure 12 : Mécanismes passifs de la tolérance périphérique des lymphocytes T
D'après (Walker and Mannie 2002)

4.2 Les lymphocytes T régulateurs

En 1969, Nishizuka et Sakakura découvrent qu'une thymectomie effectuée chez des souris âgées de 3 jours déclenche des maladies auto-immunes au niveau de différents organes (Nishizuka and Sakakura 1969; Wing, Suri-Payer et al. 2005). En 1970, Dick Gershon (Gershon and Kondo 1970) évoque l'existence de cellules dites « suppressives » pouvant inhiber l'activité de cellules reconnaissant le Soi et réguler la réponse immunitaire adaptative (Rouse 2007). Cependant, le concept de cellules suppressives a été abandonné, faute d'identification de marqueurs spécifiques de ces cellules et de leur mécanisme d'action. Il est difficile de définir et d'étudier la fonctionnalité d'une population cellulaire en l'absence de marqueurs spécifiques la caractérisant.

Quinze ans plus tard, l'équipe de Sakaguchi décrit une population cellulaire T CD4⁺ exerçant une activité régulatrice chez la souris (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995). Ces lymphocytes, aujourd'hui appelés « lymphocytes T régulateurs (ou LT régulateurs) naturels » représentent entre 5 et 10% des lymphocytes T CD4⁺ totaux chez la souris adulte. Ce travail a renouvelé l'intérêt pour les lymphocytes T régulateurs. Plusieurs populations T régulatrices sont maintenant mieux décrites grâce au nombre exponentiel d'études sur ce sujet ces dernières années.

4.2.1 Les lymphocytes T CD4⁺ régulateurs naturels

4.2.1.1 Mise en évidence

Une des premières et plus convaincantes séries d'études démontrant l'importance des lymphocytes T suppresseurs dans la prévention de l'autoimmunité spécifique d'organe a été réalisée dans le début des années 1970 (Gershon and Kondo 1970). A cette époque, ils découvrirent que les cellules T pouvaient également réguler le système immunitaire et que cette régulation n'était pas effectuée par des cellules effectrices. Le problème majeur à cette époque était le manque de marqueur de la population cellulaire qui supprimait les lymphocytes auto-réactifs et l'ignorance des mécanismes d'action (Sakaguchi, Wing et al. 2007).

Les observations de l'équipe de Sakaguchi en 1995, constituèrent une avancée majeure dans la compréhension de la fonction des cellules suppressives. En effet, ils ont montré que le transfert d'une population lymphocytaire déplétée en LT CD4⁺ CD25⁺ dans une souris athymique nude entraînait le développement spontané de maladies auto-immunes multiples chez les receveurs (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995). Ce travail est confirmé par celui d'une autre équipe qui met en évidence le rôle de cette population régulatrice dans la prévention de l'auto-immunité (Suri-Payer, Amar et al. 1998) et démontre l'activité régulatrice de ces cellules *in vitro* de façon reproductible (Thornton and Shevach 1998). Des cellules T CD4⁺CD25⁺ humaines avec des propriétés fonctionnelles très similaires à celle des cellules T CD4⁺CD25⁺ murines ont ensuite été identifiées par plusieurs groupes (Baecher-Allan, Brown et al. 2001; Ng, Duggan et al. 2001; Stephens, Mottet et al. 2001).

4.2.1.2 Ontogénie des lymphocytes T régulateurs naturels

L'origine thymique des LT régulateurs naturels a été démontrée d'une part grâce aux expériences de Sakaguchi qui observe l'absence de LT CD4⁺ CD25⁺ en périphérie chez des souris ayant subi une thymectomie à l'âge de 3 jours malgré un développement normal des autres lymphocytes T (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995; Papiernik and Banz 2001), et d'autre part par Papiernik et ses collaborateurs (Papiernik, de Moraes et al. 1998). Ce concept est soutenu par le fait que des patients atteints du syndrome de DiGeorge, présentant une hypoplasie thymique, ont peu de LT régulateurs naturels en périphérie (Sullivan, McDonald-McGinn et al. 2002). Cependant, les mécanismes du développement de ces cellules sont mal connus.

4.2.1.3 Prolifération des lymphocytes T régulateurs naturels

La question de la capacité proliférative des Trég naturels est importante spécialement dans une optique d'utilisation thérapeutique. Les cellules T CD4⁺ CD25⁺ sont considérées comme anergiques *in vitro*. Cela signifie qu'elles ne répondent pas à une stimulation conventionnelle du TCR mais l'ajout d'IL-2 permet de lever cette hypo-réponse (Thornton and Shevach 1998; Sakaguchi 2004). Cependant, plusieurs travaux mettent en évidence une prolifération des Trég naturels *in vitro* mais également *in vivo*. Ainsi, la prolifération de LT régulateurs CD4⁺ CD25⁺ naturels humains *in vitro* a notamment été observée après une stimulation par des cellules dendritiques exprimant GILZ (Glucocorticoid-induced leucine zipper) suite à un traitement avec des glucocorticoïdes (Hamdi, Godot et al. 2007). Ces cellules peuvent également proliférer *in vitro* suite à une stimulation par des cellules dendritiques matures traitées par du LPS exprimant IDO (indoleamine 2,3-dioxygénase). Suttmüller et ses collaborateurs ont montré que les LT régulateurs CD4⁺ CD25⁺ peuvent proliférer *in vitro* suite à une stimulation avec du Pam-3-Cys, un ligand de TLR-2 (Suttmüller, den Brok et al. 2006). *In vivo*, l'administration de fortes doses d'IL-2 à des patients entraîne une augmentation du nombre de LT CD4⁺ CD25^{high} circulants. Ces LT expriment Foxp3 et exercent une activité suppressive *in vitro* (Ahmadzadeh and Rosenberg 2006). Des LT régulateurs CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ sécrétant de l'IL-10 et du TGF- β ont également été retrouvés parmi les lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL) obtenus à partir de tumeurs de patients atteints de « HNSCC » (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma) (Strauss, Bergmann et al. 2007).

Les LT régulateurs naturels inhibent la prolifération et les fonctions effectrices des LT CD4⁺ et CD8⁺, la prolifération, la production d'anticorps et la permutation de classe des lymphocytes B, la cytotoxicité des cellules NK et NKT, la maturation et la fonctionnalité des cellules dendritiques ainsi que la fonction et la survie des neutrophiles (Rouse 2007). Néanmoins, leur mécanisme d'action est mal connu. *In vitro*, il semblerait que l'activité suppressive des LT régulateurs naturels nécessite un contact direct entre le LT régulateur et la cellule répondeuse par l'intermédiaire de la cellule présentatrice d'antigène (Thornton and Shevach 1998; Sakaguchi 2004). En effet, les LT régulateurs n'exercent pas d'activité suppressive lorsqu'ils sont séparés des lymphocytes T répondeurs par une membrane semi-perméable ; de plus, le surnageant de LT régulateurs naturels activés n'inhibe pas la prolifération des lymphocytes T répondeurs (Sakaguchi 2004). L'action suppressive des LT

régulateurs naturels nécessite donc un contact *in vitro* mais les molécules impliquées ne sont pas bien identifiées.

Nous savons que les LT régulateurs naturels exercent leur activité suppressive de manière antigène non spécifique ; cette régulation a même été observée entre différentes espèces. En effet, des LT régulateurs naturels de souris peuvent exercer une activité suppressive sur des lymphocytes T effecteurs de rat (Shimizu, Yamazaki et al. 2002). Le TGF- β serait donc un bon candidat pour induire l'activité suppressive des LT régulateurs naturels puisque la suppression par une cytokine est antigène non spécifique et que le TGF- β paraît conservé entre différentes espèces.

Les LT régulateurs naturels semblent donc exercer leur activité suppressive par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes qui paraissent différents selon la situation.

4.2.2 Les lymphocytes T CD4⁺ adaptatifs ou induits

4.2.2.1 Lymphocytes CD4⁺CD25⁺ induits

Comme nous l'avons vu précédemment, plusieurs études ont montré que les LT régulateurs CD4⁺ CD25⁺ étaient générés dans le thymus. Or, malgré l'involution du thymus à partir de l'adolescence, on retrouve des LT CD4⁺ CD25⁺ en périphérie tout au long d'une vie. De plus, les LT régulateurs CD4⁺ CD25⁺ ne suppriment pas seulement des réponses immunitaires spécifiques d'antigènes du Soi (Taams and Akbar 2005). Comment expliquer ce phénomène sachant que seuls les antigènes du Soi sont présentés dans le thymus? Plusieurs travaux ont mis en évidence que des lymphocytes T CD4⁺ CD25⁺ ayant les mêmes caractéristiques que les LT régulateurs naturels peuvent être générés en périphérie (Walker, Chodos et al. 2003; Walker, Carson et al. 2005). Il semblerait que des lymphocytes T CD4⁺ deviennent anergiques et exercent une activité suppressive lorsque l'antigène leur a été présenté par des cellules présentatrices d'antigène non professionnelles exprimant le CMH II comme des cellules épithéliales ou des lymphocytes T activés (Taams, van Eden et al. 1999). Comme les LT régulateurs CD4⁺ CD25⁺ naturels, les LT ainsi obtenus expriment CD25 et CTLA-4 de façon constitutive et exercent leur activité suppressive par l'intermédiaire d'un contact. Des LT régulateurs CD4⁺ CD25⁺ peuvent également être générés *ex vivo* à partir de LT CD4⁺ CD25⁻ après stimulation en présence de TGF- β . Il semblerait que ce phénomène soit le résultat de l'induction de l'expression de Foxp3 par le TGF- β (Zheng, Gray et al. 2002).

4.2.2.2 Lymphocytes Tr1

Les lymphocytes Tr1 ont été isolés pour la première fois *in vivo* chez des patients présentant une immunodéficiência sévère (SCID) ayant accepté avec succès une greffe de moelle osseuse allogénique provenant d'un donneur avec un mésappariement HLA (Bacchetta, Bigler et al. 1994). Les lymphocytes T régulateurs dits « lymphocytes Tr1 » ont ensuite été définis *in vitro* comme étant induits par stimulation antigénique répétée en présence d'IL-10 (Groux, Bigler et al. 1996; Groux, O'Garra et al. 1997). *In vivo*, contrairement aux LT régulateurs naturels, les lymphocytes Tr1 sont induits en périphérie suite à la rencontre d'un antigène dans un environnement tolérogène (Levings and Roncarolo 2005).

Les lymphocytes Tr1 régulent les réponses Th1 et Th2 *in vitro* et *in vivo*, ainsi que la production d'anticorps par les lymphocytes B. Ils semblent exercer leur activité suppressive via la sécrétion de cytokines régulatrices : selon les études, l'activité suppressive des lymphocytes Tr1 est due à l'IL-10 seule ou associée au TGF- β . Néanmoins, des lymphocytes T régulateurs produisant de l'IL-10, et donc dits « Tr1 » ou « Tr1-like », dont le mécanisme d'action n'est pas dépendant de l'IL-10 ont également été décrits (Jonuleit, Schmitt et al. 2000; Vieira, Christensen et al. 2004).

Les lymphocytes Tr1 ont besoin d'un contact cellulaire spécifique d'antigène avec la cellule présentatrice pour exercer leur activité suppressive mais une fois activés, ils peuvent réguler la réponse immunitaire de manière non spécifique par l'intermédiaire des cytokines qu'ils sécrètent, indépendamment d'un contact cellulaire (Groux, O'Garra et al. 1997; Roncarolo, Levings et al. 2001). Les lymphocytes Tr1 peuvent également éduquer des lymphocytes T CD4⁺ à devenir régulateurs via la sécrétion d'IL-10.

Les lymphocytes Tr1 semblent jouer un rôle dans la tolérance de greffe allogénique. Ainsi, les lymphocytes T régulateurs exerçant leur activité suppressive par l'intermédiaire de l'IL-10 et du TGF- β ont été isolés chez des patients ayant développé une tolérance spontanée suite à une greffe de rein ou de foie (VanBuskirk, Burlingham et al. 2000). Par ailleurs, l'existence d'un polymorphisme associé à une sécrétion élevée d'IL-10 semble être un facteur protecteur envers la GvHD (Graft versus Host Disease) après une greffe de cellules souches hématopoïétiques (Lin, Storer et al. 2003; Lin, Storer et al. 2005; Battaglia and Roncarolo 2006).

4.2.3 Caractéristiques phénotypiques et synthèse de cytokines des cellules régulatrices

Les LT régulateurs naturels ont tout d'abord été identifiés chez la souris par leur expression constitutive du CD25. Chez l'Homme, les LT régulateurs naturels expriment également le CD25 mais contrairement aux cellules murines où la population CD4⁺ CD25⁺ est bien distincte, le marquage du CD25 sur les LT CD4⁺ humains est « continu » en cytométrie, ne faisant donc pas clairement apparaître deux populations séparées. Ce marquage révèle environ 20 à 30% de cellules CD4⁺ CD25⁺ dont seulement 3 à 5 % (cellules exprimant fortement le CD25 dites « CD25^{high} ») ont une activité régulatrice (Baecher-Allan, Brown et al. 2001; Wing, Suri-Payer et al. 2005). De plus, le CD25 n'apparaît pas comme un marqueur optimal des LT régulateurs naturels car il est également exprimé sur les lymphocytes T CD4⁺ activés. L'isolement des LT régulateurs naturels par rapport à ce marqueur, certes plus facile chez la souris (sauf en présence d'inflammation) que chez l'Homme, n'est donc pas aisé. Par ailleurs, il semblerait que certaines cellules CD4⁺ CD25⁻ aient également des propriétés régulatrices (Curotto de Lafaille and Lafaille 2002).

Depuis plusieurs années, les travaux de recherche sur les lymphocytes T régulateurs se sont multipliés, en particulier dans le but de trouver d'autres marqueurs pour mieux les caractériser. Chez l'Homme, les LT régulateurs naturels CD25^{high} isolés dans le sang périphérique expriment constitutivement GITR, CD45RO, CTLA-4 intracellulaire, CD71, HLA-DR, CD122 (chaîne β du récepteur à l'IL-2), CD132 (chaîne γ du récepteur à l'IL-2), Ox40, PDL-1 et ICOS ; ils semblent également exprimer les récepteurs CCR4 et CCR8 (Levings and Roncarolo 2005). Les LT régulateurs naturels humains semblent présenter une faible expression de CD127 (chaîne α du récepteur de l'IL-7) (Rouse 2007).

Cependant, aucun de ces marqueurs n'est spécifique des lymphocytes T régulateurs naturels car ils peuvent également être exprimés de façon transitoire par les lymphocytes T CD4⁺ activés.

En 2003, le facteur de transcription Foxp3 (Forkhead box transcription factor) a été décrit comme étant spécifiquement exprimé par les LT régulateurs naturels et étant essentiel à leur développement (Rouse 2007). En effet, la souris Scurfy et l'Homme atteint du syndrome IPEX (Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked) développent des maladies auto-immunes liées à une déficience en cellules T régulatrices qui serait due à une mutation dans le gène codant Foxp3 (Shevach 2006). La reconstitution de souris Scurfy avec des cellules CD4⁺ CD25⁺ ou l'expression du transgène Foxp3 chez ces souris diminue et

éradique les symptômes auto-immuns (Ziegler 2006). Chez la souris, la corrélation entre l'expression de Foxp3 et de CD25 est excellente, même si quelques cellules (environ 10%) sont CD25⁺ Foxp3⁻ ou CD25⁻ Foxp3⁺, ce qui permet d'identifier assez facilement les lymphocytes T régulateurs (Shevach 2006). En revanche, l'expression de Foxp3 n'est pas exclusivement retrouvée chez les cellules CD4⁺ CD25^{high} chez l'Homme; en effet, certaines cellules CD25^{int} l'expriment aussi. Par ailleurs, l'expression de Foxp3 peut être engendrée par l'activation des cellules CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁻ et CD8⁺ CD25⁻ Foxp3⁻ humaines via le TCR, ce qui n'est pas le cas chez la souris (Shevach 2006).

Du point de vue de leur profil de sécrétion des cytokines, les Trég naturels sécrètent peu d'IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 et d'IFN- γ *in vitro*. En revanche, ils semblent sécréter du TGF- β mais à un niveau non significativement différent de celui produit par des cellules non suppressives (Levings and Roncarolo 2005). Malgré leur incapacité à produire de l'IL-2, cette cytokine est un facteur clé de croissance et de survie des LT régulateurs naturels. En effet, on ne retrouve pas de LT régulateurs naturels ni dans le thymus ni en périphérie chez des souris IL-2 KO (Papiernik and Banz 2001).

En ce qui concerne les lymphocytes Tr1, aucun marqueur spécifique n'a été identifié pour le moment. Contrairement aux LT régulateurs naturels, les lymphocytes Tr1 n'expriment pas CD25 ni Foxp3 de façon constitutive. L'expression de Foxp3 observée dans les lymphocytes Tr1 est comparable à celle des lymphocytes T CD4⁺ CD25⁻ activés (Vieira, Christensen et al. 2004; Levings and Roncarolo 2005). Ils expriment des niveaux plus ou moins élevés de CD25, CD40L, CD69, HLA-DR et CTLA-4 intracellulaire. Ils semblent constitutivement exprimer les chaînes β et γ du récepteur de l'IL-2 et de l'IL-15 (CD122 et CD132). Les lymphocytes Tr1 murins exprimeraient également GITR et CD103 (intégrine $\alpha\beta 7$) (Levings and Roncarolo 2005). La caractérisation de ces cellules T régulatrices par l'expression de marqueurs à leur surface est difficile. Les lymphocytes Tr1 sont caractérisés par un profil de sécrétion de cytokines particulier : ils sécrètent de l'IL-10, du TGF- β et de l'IL-5. Ils peuvent produire de faibles quantités d'IL-2 et ne sécrètent pas d'IL-4. Contrairement aux lymphocytes Tr1 murins, les lymphocytes Tr1 humains peuvent aussi produire de l'IFN- γ , mais en quantité plus faible (environ dix fois moins) que les lymphocytes Th1 (Levings and Roncarolo 2005).

4.2.4 Mécanismes d'action des lymphocytes T régulateurs

La fonction principale des lymphocytes T régulateurs étant de supprimer la fonction effectrice des lymphocytes T, de nombreuses équipes se sont appliquées à identifier les différents mécanismes d'action mis en jeu par ces Trég pour exercer leur fonction suppressive. Les nombreux mécanismes utilisés peuvent être regroupés en 4 grands groupes : suppression par des cytokines inhibitrices (IL-10, TGF- β et IL-35), suppression par contact cellulaire direct avec la cible (cytolyse ou molécules membranaires ayant une action inhibitrice sur la cible), suppression par altération métabolique qui est liée à une déprivation en IL-2, le transfert de l'AMPc ou le relargage d'adénosine et enfin suppression par action sur les cellules dendritiques (**Figure 13**). Tous ces mécanismes vont être plus amplement détaillés dans les paragraphes suivants.

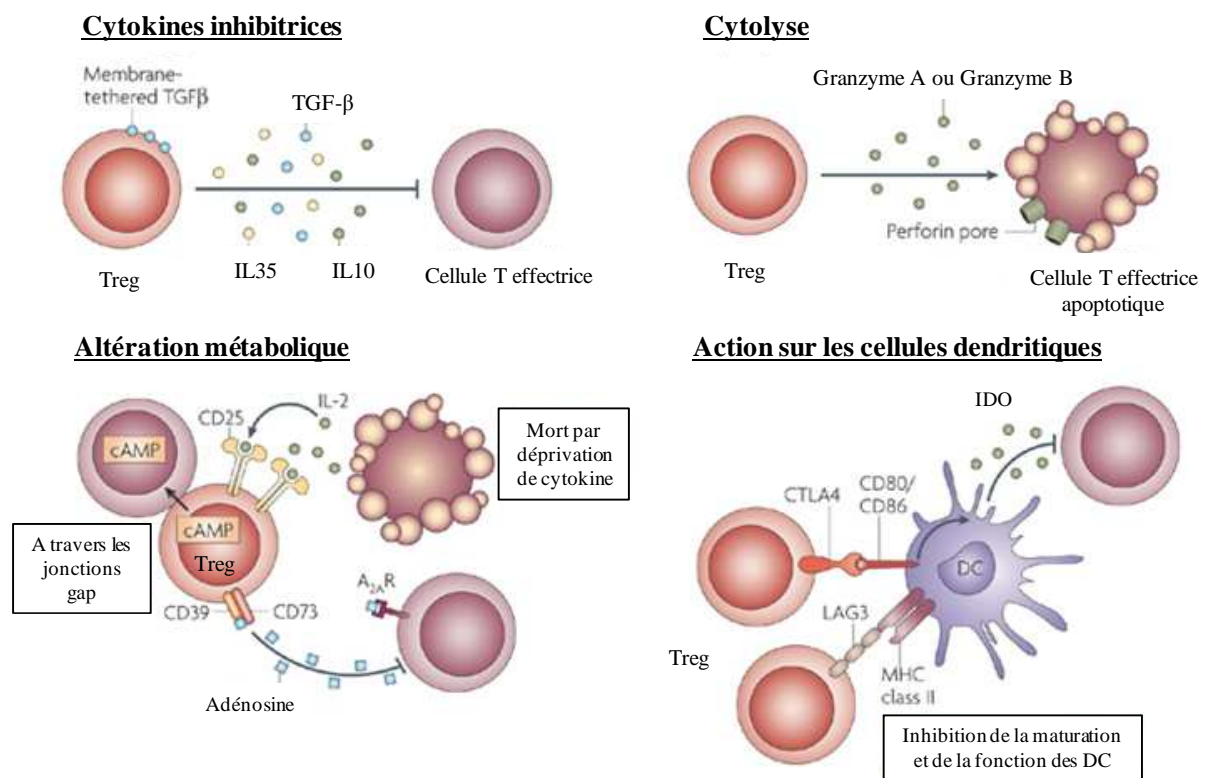


Figure 13 : Mécanismes d'action des lymphocytes T régulateurs (Vignali, Collison et al. 2008)

4.2.4.1 Suppression par les cytokines inhibitrices :

L'importance de la cytokine inhibitrice IL-10 dans la fonction suppressive des Trég naturels dérivés du thymus fait débat. En effet, des études *in vitro* utilisant des anticorps neutralisants ou des cellules T incapables de produire de l'IL-10 démontrent que cette cytokine n'est pas essentielle à la fonction des Trég (Takahashi, Kuniyasu et al. 1998; Thornton and Shevach 1998; Jonuleit, Schmitt et al. 2001). Cependant, ceci est en contradiction avec des résultats obtenus *in vivo* (Annacker, Asseman et al. 2003; Hawrylowicz and O'Garra 2005). Des modèles d'asthme et d'allergie suggèrent qu'à la fois les Trég naturels et les Trég induits antigène-spécifiques contrôlent ces maladies de manière IL-10 dépendante (Hawrylowicz and O'Garra 2005). Il a également été montré que l'IL-10 était cruciale pour le contrôle de certaines infections pour lesquelles les Trég sont impliqués comme *Mycobacterium tuberculosis* (Kursar, Koch et al. 2007) et *Toxoplasma gondii* (Jankovic, Kullberg et al. 2007). Cependant, les Trég n'étaient pas la source d'IL-10 dans ces modèles. Par contre, l'IL-10 est requise pour le blocage de l'immunité antitumorale (Loser, Apelt et al. 2007). L'IL-10 produite par les Trég peut aussi être importante pour l'induction de tolérance dans un modèle d'hépatite générée par la concavaline A (Erhardt, Biburger et al. 2007) et pour la tolérance vis-à-vis de superantigènes bactériens et viraux (Ivars 1992). Finalement, la production d'IL-10 par les Trég comme un mécanisme de suppression est surtout dépendant de l'organisme cible et du modèle expérimental.

Bien que certaines études *in vitro* avec des anticorps bloquants anti TGF- β ou des Trég ne produisant pas de TGF- β indiquent que cette cytokine n'est pas requise pour la fonction des Trég naturels (Takahashi, Kuniyasu et al. 1998; Piccirillo, Letterio et al. 2002), d'autres études réalisées à la fois *in vitro* et *in vivo* suggèrent un rôle crucial du TGF- β membranaire des Trég (Nakamura, Kitani et al. 2001; Green, Gorelik et al. 2003). Ainsi, le TGF- β produit par les Trég a été montré comme étant important dans le contrôle de la réponse immune à *Mycobacterium tuberculosis* (Kursar, Koch et al. 2007) et dans la suppression des réponses allergiques (Joetham, Takeda et al. 2007). De manière intéressante, cette cytokine limite également l'immunité antitumorale dans un modèle de carcinome (Strauss, Bergmann et al. 2007) et dans le lymphome folliculaire (Hilchey, De et al. 2007) en rendant les cellules T insensibles à la tumeur. Le TGF- β membranaire est aussi impliqué dans la fonction suppressive des Trég via un contact cellulaire (Nakamura, Kitani et al. 2001). Les Trég sont ainsi capables de contrôler l'infiltration des cellules T CD8⁺ dans les îlots pancréatiques et de retarder la progression du diabète grâce au TGF- β membranaire (Green, Gorelik et al. 2003).

Par conséquent, il apparaît maintenant clair que le TGF- β soluble et/ou membranaire possède un rôle dans la fonction des Trég naturels.

4.2.4.2 Suppression par cytolyse :

La cytolyse induite par la sécrétion des molécules « Granzymes » a longtemps été associée aux cellules NK et aux lymphocytes T CD8⁺ (CTL) (Lieberman 2003). Cependant, les lymphocytes T régulateurs CD4⁺ humains peuvent également exercer une activité cytolytique *in vivo* grâce au granzyme A et à la perforine (Grossman, Verbsky et al. 2004; Puccetti and Grohmann 2007). Les Trég sont également capables d'inhiber la capacité des cellules NK et des CTL à éliminer les tumeurs en « tuant » ces cellules de manière granzyme B-dépendante et partiellement perforine-dépendante (Cao, Cai et al. 2007). D'autres études suggèrent que les Trég activés induisent l'apoptose des cellules T effectrices par la voie TRAIL-DR5 (tumor-necrosis-factor-related-apoptosis-inducing-ligand-death-receptor 5) (Ren, Ye et al. 2007). De plus, la galectine 1 qui peut induire l'apoptose des cellules T a été montrée comme étant exprimées de façon importante par les Trég humains et murins (Garin, Chu et al. 2007).

4.2.4.3 Suppression par altération métabolique :

La consommation de l'IL-2 locale par les Trég, due entre autres à leur forte expression de CD25, peut induire l'apoptose des cellules effectrices qui se retrouvent avec trop peu d'IL-2 pour survivre (Pandiyani, Zheng et al. 2007). Deux nouveaux mécanismes ont été décrits depuis comme le relargage intracellulaire ou extracellulaire de l'adénosine et le transfert d'AMPc. Ainsi, les Trég expriment les ectoenzymes CD39 et CD73 afin de générer de l'adénosine péricellulaire qui est capable de supprimer la fonction effectrice des cellules T via l'activation du récepteur à l'adénosine A_{2A}R (Kobie, Shah et al. 2006; Borsellino, Kleinewietfeld et al. 2007; Deaglio, Dwyer et al. 2007). De plus, les Trég semblent pouvoir inhiber directement la fonction effectrice des cellules T en transférant l'AMPc (second messenger inhibiteur) dans les lymphocytes T effecteurs grâce à des jonctions gap membranaires (Bopp, Becker et al. 2007).

4.2.4.4 Suppression par action sur les cellules dendritiques :

En plus de l'effet direct des Trég sur la fonction des cellules effectrices, les cellules T régulatrices peuvent également moduler la maturation et la fonction des DC qui sont requises

pour l'activation des cellules T effectrices. Peu de choses sont connues sur l'impact des Trég sur les DC. Cependant, certaines études ont tout de même rapportées les effets suppresseurs *in vitro* des Trég naturels sur les DC murines et humaines mais également *in vivo* (Tang, Maricic et al. 2006). Ce phénomène inclut la diminution de l'expression des molécules de co-stimulation et du CMH de classe II, la diminution de la fonction de présentation antigénique dans une MLR et la modification de la production des cytokines pro-inflammatoires IL-12, IL-6 et TNF- α (Cederbom, Hall et al. 2000; Misra, Bayry et al. 2004; Oderup, Cederbom et al. 2006; Veldhoen, Moncrieffe et al. 2006; Bayry, Triebel et al. 2007; Mahnke, Ring et al. 2007; Liang, Ristich et al. 2008; Onishi, Fehervari et al. 2008). Les mécanismes précis impliqués dans ce processus ne sont pas connus mais cette modulation peut impliquer des facteurs solubles (IL-10 et TGF- β) ou des molécules de surface exprimées par les Trég.

Ainsi, les Trég forment des agrégats autour de la DC grâce à un mécanisme dépendant de LFA-1 (Onishi, Fehervari et al. 2008) puis entraînent de façon spécifique la diminution d'expression des molécules de costimulation CD80/CD86 via un phénomène dépendant de LFA-1 et CTLA-4 (Onishi, Fehervari et al. 2008). L'interaction des Trég avec les DC altère leur capacité à maintenir une interaction de longue durée avec les cellules T effectrices (Tadokoro, Shakhar et al. 2006) : la molécule CTLA-4 semble jouer un rôle dans ce processus (Oderup, Cederbom et al. 2006). Il a également été montré que les Trég peuvent interagir via CTLA-4 avec les molécules de costimulation CD80/CD86 des DC afin d'induire l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO), une molécule immunosuppressive qui est connue pour induire la production de métabolites pro-apoptotiques à partir du tryptophane, résultant ainsi dans la suppression des cellules T effectrices (Fallarino, Grohmann et al. 2003; Mellor and Munn 2004). D'autres études suggèrent que LAG-3 (Lymphocyte Activating Gene 3 ou CD223) exprimée par les Trég peut bloquer la maturation des DC humaines (Bayry, Triebel et al. 2007) et murines (Liang, Workman et al. 2008). Enfin, une autre étude récente met en évidence que la neuropiline 1 exprimée par les Trég prolonge leurs interactions avec les DC immatures (Sarris, Andersen et al. 2008). Finalement, une interaction mutuelle entre les Trég et les DC permet le maintien de l'immunosuppression.

4.3 Les cellules dendritiques tolérogènes

On sait maintenant que les DC ont un rôle important dans l'induction de la tolérance. On a pendant longtemps considéré que seules les DC immatures pouvaient induire de la tolérance et que les DC matures généraient une réponse immune effectrice. Ce concept n'est plus valable actuellement.

4.3.1 Concept des cellules dendritiques tolérogènes

Nous avons vu précédemment que les DC, après activation par différents signaux de « danger » inhérents à une infection ou une inflammation, vont migrer vers les organes lymphoïdes secondaires pour induire une réponse immune effectrice. En condition normale sans pathogène ni inflammation, une migration spontanée des DC vers les organes lymphoïdes secondaires se produit également. Ainsi, les cellules de Langerhans quittent la peau après la perte de molécules d'ancrage comme la E-cadhérine et expriment CCR7 permettant le guidage de ces cellules vers les ganglions en l'absence de toute infection (Randolph 2001; Jiang, Bloom et al. 2007). De même, des DC semblent capables de transporter, à l'état stable, des cellules épithéliales apoptotiques vers la zone T des ganglions mésentériques suggérant ainsi un rôle dans l'induction et le maintien de la tolérance périphérique intestinale (Huang, Platt et al. 2000). Ces cellules ne sont pas des DC immatures et ont atteint un certain degré d'activation car elles expriment les molécules de co-stimulation CD80/CD86, le CMH-II et le CCR7 (Stoitzner, Holzmann et al. 2003; Ip and Lau 2004; Jiang, Bloom et al. 2007). Ces cellules migratoires sont chargées avec des antigènes tissulaires probablement internalisés par phagocytose. Par ce biais, des antigènes du Soi sont donc transportés jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires pour une induction de tolérance. En effet, ces DC ont migré et ont mûri en absence de danger et ne semblent pas synthétiser de cytokines inflammatoires nécessaires à l'induction d'une immunité (Jiang, Bloom et al. 2007).

4.3.2 Manipulation des cellules dendritiques pour promouvoir la tolérance

La manipulation des DC *in vitro* par des agents anti-inflammatoires ou immunosuppresseurs peut générer des DC dans un état appelé parfois « semi mature » qui ont des propriétés dites « pro-toléro-gènes ». Ces agents ciblent la différenciation et la fonction des DC par différents mécanismes (Hackstein and Thomson 2004) et incluent notamment l'IL-10 (Steinbrink, Graulich et al. 2002; Nolan, Strong et al. 2004), le TGF- β (Geissmann, Revy et al. 1999; Lu, Lee et al. 1999; Strobl and Knapp 1999), les inducteurs d'AMPc comme la PGE2 (Vassiliou, Jing et al. 2003), l'histamine (Caron, Delneste et al. 2001), les agonistes β 2, les neuropeptides (Gonzalez-Rey, Chorny et al. 2006; Delgado 2009), la vitamine D3 (Penna and Adorini 2000; Pedersen, Gad et al. 2004), la glucosamine, les ligands des molécules inhibitrices ILT comme HLA-G (Le Friec, Laupeze et al. 2003; Liang, Ristich et al. 2008) ou encore la protoporphyrine de cobalt (Chauveau, Remy et al. 2005). De plus, les effets des traitements immunosuppresseurs comme les corticostéroïdes (de Jong, Vieira et al. 1999; Woltman, de Fijter et al. 2000), la cyclosporine (Lee, Ganster et al. 1999; Duperrier, Farre et al. 2002), le tacrolimus (Shimizu, Fujii et al. 2000; Steinschulte, Taner et al. 2003), la rapamycine (Taner, Hackstein et al. 2005; Turnquist, Raimondi et al. 2007), l'aspirine (Matasic, Dietz et al. 2000; Hackstein, Morelli et al. 2001), le deoxyspergualine (DSG) (Thomas, Contreras et al. 1999; Yang, Bernier et al. 2003), le MMF (Lagaraine, Hoarau et al. 2005) et la sanglifehrine A (Steinschulte, Taner et al. 2003) ont été largement étudiés sur la différenciation et la fonction des DC. Toutes ces molécules réduisent la maturation et/ou l'activation des DC ou empêchent les DC de produire de l'IL-12p70. Par ailleurs, certains de ces agents inhibent la translocation nucléaire des membres de la famille de NF- κ B qui sont indispensables à la différenciation des DC (Morelli and Thomson 2003; Hackstein and Thomson 2004; Chauveau, Remy et al. 2005).

Certaines avancées technologiques dans le transfert de gènes ont permis d'augmenter le potentiel toléro-gène des DC. En effet, ces DC sont génétiquement manipulées afin d'exprimer des molécules dites « immunosuppressives » comme l'IL-10, le TGF- β ou la protéine de fusion CTLA-4 Ig (Sun, Wang et al. 2003; Vacca, Fallarino et al. 2005) ce qui conduit à l'inhibition ou au blocage de l'expression des molécules de co-stimulation. Ces procédés génétiques peuvent également inclure l'expression de la forme dominante négative IKK2 (I κ B-Kinase 2) empêchant l'activation de NF- κ B (Tan, Sagoo et al. 2005), l'expression d'IDO pour inhiber la prolifération des cellules T allogéniques ou encore l'expression de

CD95L (Chuang, Suen et al. 2006) pour promouvoir la déletion des cellules T antigène-spécifiques. Enfin, Hill et collaborateurs ont rapporté que les DC murines dans lesquelles la production d'IL-12 était éteinte par RNA interférence possédaient une capacité allostimulatrice diminuée mais induisaient l'orientation des cellules T vers un profil Th2 de manière antigène spécifique (Hill, Ichim et al. 2003).

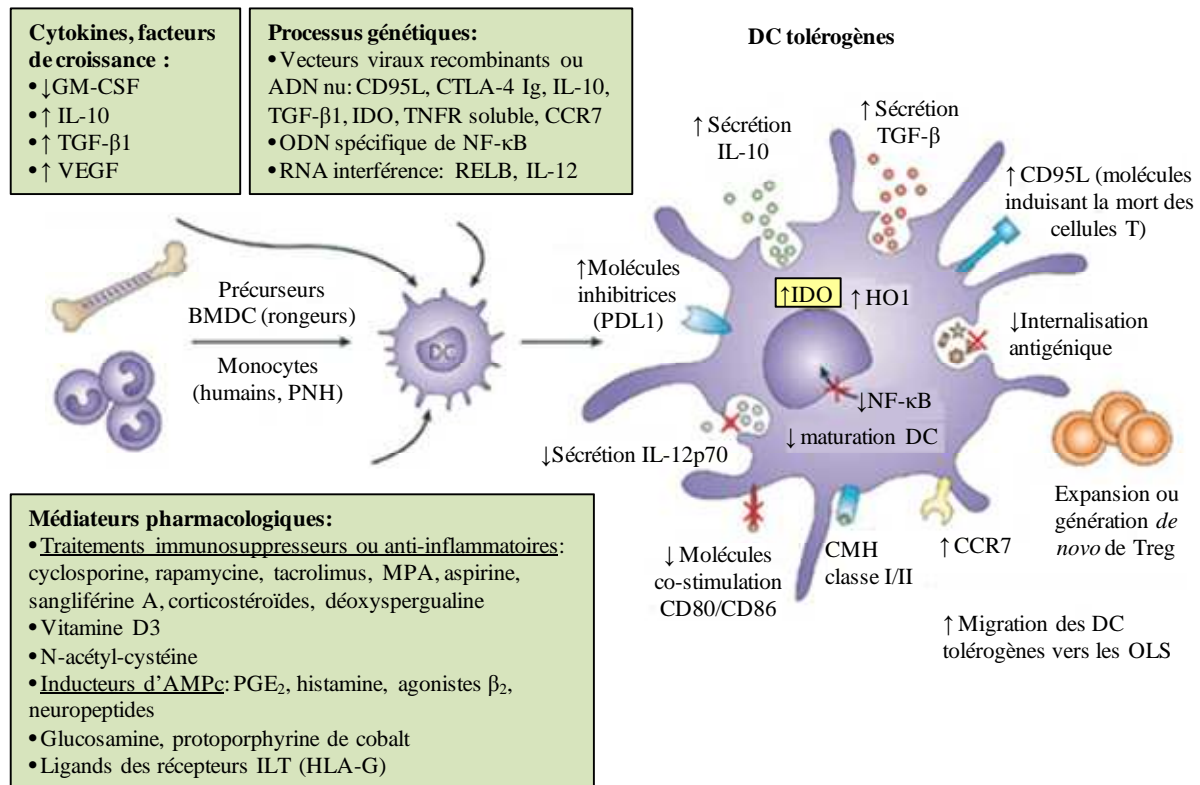


Figure 14 : Génération de DC toléro-gènes *in vitro* (d'après (Morelli and Thomson 2007))

4.3.3 Caractéristiques des cellules dendritiques toléro-gènes

Les DC dites « toléro-gènes » peuvent produire des cytokines connues pour être anti-inflammatoires et pro-toléro-gènes comme l'IL-10 et le TGF-β (Coombes, Siddiqui et al. 2007), et ainsi favoriser l'activation et / ou l'émergence de lymphocytes T régulateurs. Bien qu'aucun marqueur spécifique des DC toléro-gènes ne soit décrit, l'expression des molécules ILT3 et ILT4, exprimées essentiellement sur les monocytes, macrophages et cellules dendritiques, a été associée à des DC toléro-gènes. Les cellules dendritiques exprimant

fortement les molécules ILT3 et ILT4 induisent une anergie des cellules T (Chang, Ciubotariu et al. 2002; Manavalan, Rossi et al. 2003). L'expression de la molécule IDO a également été associée à certaines DC dites « tolérogènes ». Il s'agit d'une enzyme clé du catabolisme du tryptophane qui entraîne une déplétion du milieu en tryptophane ainsi que l'arrêt de la prolifération des cellules T car le tryptophane est un acide aminé essentiel à leur prolifération (Munn, Sharma et al. 2002; Mellor and Munn 2004). Ces lymphocytes T activés dont la prolifération est inhibée par IDO sont bloqués en phase G1 du cycle cellulaire et sont plus sensibles à l'apoptose (Lee, Park et al. 2002). Une étude récente a également démontré qu'une faible proportion de DC plasmacytoïdes murines activées par du CpG, ligand de TLR9, sécrétant la molécule IDO empêchait la conversion des lymphocytes T régulateurs en lymphocytes effecteurs Th17 (Baban, Chandler et al. 2009).

L'expression de cette molécule est induite dans les DC par la PGE₂, l'IFN γ et CTLA-4 (Grohmann, Orabona et al. 2002; Mellor and Munn 2004; Braun, Longman et al. 2005). Ceci implique que des cellules exprimant CTLA-4 (comme les Treg) peuvent induire l'expression d'IDO sur les DC, qui à leur tour deviennent tolérogènes et peuvent potentialiser l'action des Trég en limitant la prolifération des lymphocytes T effecteurs (**Tableau 1**).

| Phénotype | Cytokines | Fonction |
|--|-----------|---|
| ↓ molécules costimulation (CD80, CD86...) | ↑ IL-10 | ↑ mort par apoptose des LT effecteurs |
| ↑ molécules inhibitrices (PDL-1, ILT3, ILT4...) | ↑ IDO | Génération ou expansion de Trég naturels ou adaptatifs alloantigène-spécifiques |
| ↑ CCR7 | ↓ IL-12 | Résistance à la maturation en réponse aux « signaux dangers » (HMGB1, TLR, CD40L...) |

Tableau 1 : Résumé des caractéristiques des cellules dendritiques tolérogènes

Les DC tolérogènes présentent les antigènes aux cellules T spécifiques d'antigènes mais échouent dans la délivrance d'un signal complet de costimulation ou éventuellement procurent un signal inhibiteur pour l'activation et la prolifération des cellules T. Cette absence d'activation efficace peut se manifester par la mort de la cellule T, l'anergie ou la génération de cellules T régulatrices (Morelli and Thomson 2007). Ces différentes observations laissent penser que le microenvironnement dans lequel la DC a internalisé et présenté l'antigène influence grandement sur la capacité immunogène ou tolérogène de ces cellules.

III. HOMEOSTASIE CALCIQUE DES CELLULES NON-EXCITABLES : LES CELLULES IMMUNITAIRES

Depuis le 19^e siècle, le calcium (Ca^{2+}) est connu comme un composant de la matrice osseuse et dentaire mais également comme un signal ubiquitaire contrôlant de nombreux événements cellulaires (intra- comme extracellulaires). En 1883, Sidney RINGER a montré le rôle prépondérant de cet ion lors de la contraction cardiaque de grenouille (Ringer 1883; Ringer 1883). Mais ce n'est que depuis les années 1980 que son rôle dans la signalisation cellulaire commence à être étudié. Le Ca^{2+} intervient autant dans la physiologie animale que végétale afin de transmettre des signaux membranaires vers leurs cibles intracellulaires. Il participe à tous les stades de développement : lors de la reprise de méiose, lors de la fécondation et au cours des certaines étapes du développement embryonnaire. Dans les cellules différenciées, il est indispensable et par conséquent contrôle la contraction musculaire, la sécrétion, l'endo- et l'exocytose, la prolifération, la différenciation, l'apoptose ; mais intervient également dans des principes nerveux tels que la mémoire et l'apprentissage (Berridge, Lipp et al. 2000; Carafoli 2002) (**Figure 15**).

La signalisation cellulaire par le Ca^{2+} est très souvent liée à une augmentation de sa concentration intracellulaire. Le signal calcique est caractérisé par son amplitude, sa durée mais également par sa fréquence et son origine. Ce signal peut durer de quelques millisecondes à plusieurs heures. Il peut également être de nature transitoire ou sous forme d'oscillations. Cependant, une forte concentration intracellulaire en Ca^{2+} est toxique pour la cellule car il a tendance à précipiter le phosphate inorganique, nécessaire à la synthèse d'ATP. C'est pourquoi le niveau intracellulaire en Ca^{2+} est soumis à une régulation minutieuse. Ceci se traduit par un effet tampon grâce à des protéines capables de fixer le Ca^{2+} , les « Calcium-binding proteins » ou grâce aux organites intracellulaires capables de stocker ce second messenger (RE et mitochondries). Il existe donc un gradient de concentration pour cet ion. En effet, ce gradient est important avec environ 1 à 2 mM en extracellulaire et 10^{-6} M en intracellulaire. Par ailleurs, sa concentration dans le RE est de l'ordre de 800 μM . Ce dernier est en faveur d'une entrée de Ca^{2+} dans la cellule.

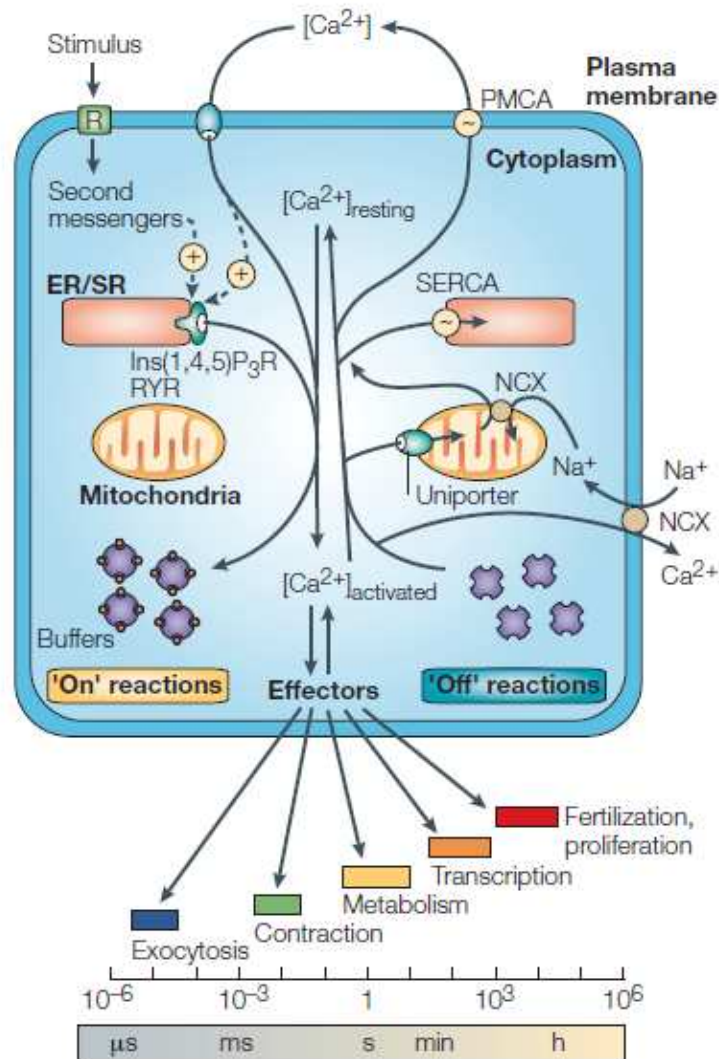


Figure 15 : Signalisation et homéostasie calcique des cellules excitables. Lors de l'activation cellulaire, les stimuli induisent l'entrée massive de Ca²⁺ provenant du milieu extracellulaire et du réticulum endoplasmique (RE). Une partie du Ca²⁺ cytoplasmique permet l'activation d'effecteurs intervenant dans de nombreux processus cellulaires. Après activation, le retour à l'état d'équilibre se fait grâce aux pompes PMCA, SERCA et échangeurs Na⁺/Ca²⁺. (Berridge, Bootman et al. 2003)

Par conséquent, l'augmentation de Ca²⁺ intracellulaire est due soit à une entrée ou influx de Ca²⁺ venant du milieu extracellulaire par l'intermédiaire de canaux de la membrane plasmique, soit à une libération soutenue ou une fuite des réserves internes au niveau du RE. Cette vidange des stocks calciques fait intervenir des récepteurs-canaux de la membrane du RE tels que les récepteurs à l'IP₃ (IP₃R, activés par le métabolisme des phosphoinositides), soit par le Ca²⁺ lui-même dans le cas des récepteurs à la Ryanodine (RyR).

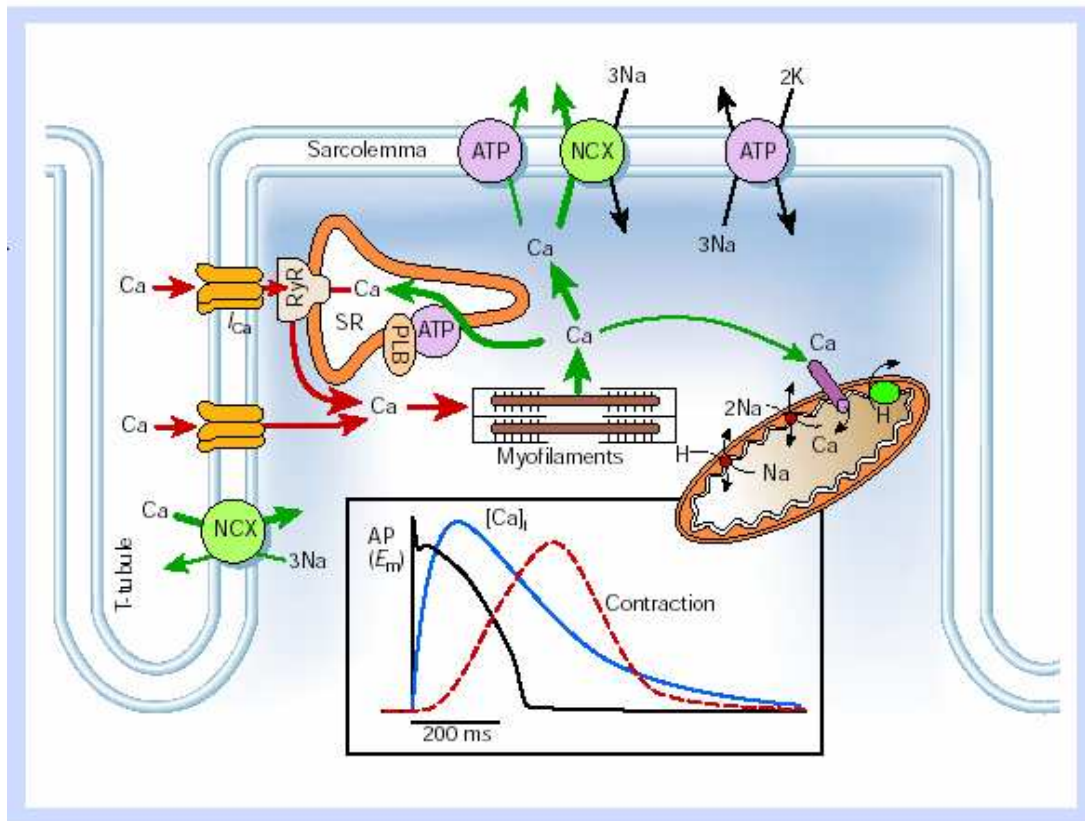


Figure 16 : Transport du Ca^{2+} dans un cardiomyocyte ventriculaire. Dans l'insert, sont représentés le déroulement d'un potentiel d'action, celui du transitoire calcique et la contraction mesurée sur une cellule ventriculaire de lapin à 37°C . NCX : échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; ATP : ATPase ; PLB : phospholambane ; SR : réticulum sarcoplasmique. (Bers 2002)

En outre, le retour à l'état de base nécessite l'intervention de protéines capables d'extruder le Ca^{2+} ou de recharger les stocks intra-réticulaires. Ce processus s'effectue par des protéines appelées Calcium-ATPases comme les pompes PMCA (Di Leva, Domi et al. 2008) (Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPases) et SERCA (MacLennan, Rice et al. 1997) (Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPases). D'autres types protéiques peuvent rentrer dans le processus d'extrusion calcique : l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. (**Figure 15**)

1. Les Canaux calciques

Les protéines responsables de l'augmentation intracytoplasmique de Ca^{2+} sont relativement bien décrites dans la littérature des cellules excitables (muscle squelettique ou lisse, cœur, systèmes nerveux). Ces canaux calciques sont des complexes multimoléculaires formant un canal capable de faire passer des ions au travers de la membrane plasmique. Ces courants participent, dans ces cellules excitables, au maintien et à la propagation de potentiel d'action le long de la membrane plasmique (Catterall 2000; Dai, Hall et al. 2009; Paradies, Petrosillo et al. 2009). Cependant, dans les cellules non-excitables, comme les cellules du système immunitaire, aucune entrée de Ca^{2+} n'est observée lors d'une dépolarisation membranaire. Cette observation exclut la possibilité de la présence **fonctionnelle** de canaux calciques dépendants du potentiel sur ces cellules ; bien que leurs expressions soient retrouvées dans le lymphocyte T, par exemple (Cabral, Paulet et al. 2010). Il existe donc d'autres voies d'entrée du Ca^{2+} dans ces cellules. En effet, les échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Herchuelz 2007), les voies sélectives et non-sélectives (Scharenberg, Humphries et al. 2007) pour le Ca^{2+} peuvent être souligné. **(Figure 17)**

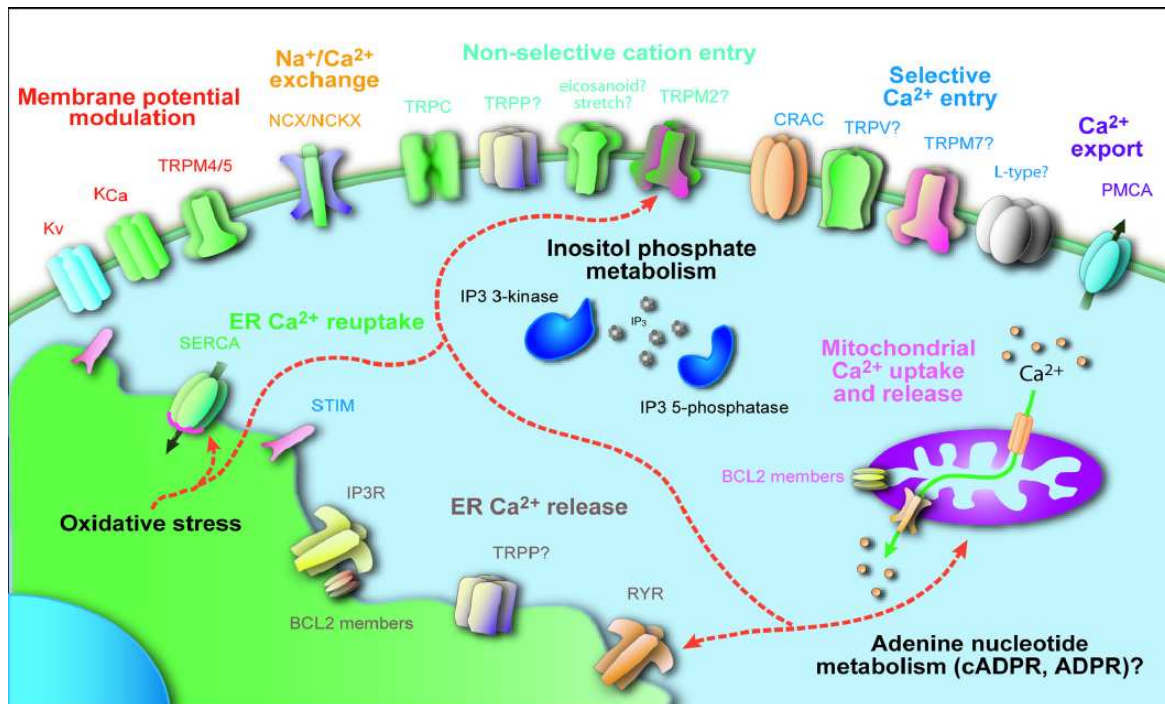


Figure 17 : Mécanismes de régulation du Ca^{2+} dans les lymphocytes B. Les voies d'entrée ou de régulation du Ca^{2+} dans le lymphocyte B sont regroupées en fonction de leurs actions et de leurs mécanismes. D'après (Scharenberg, Humphries et al. 2007)

1.1 Les canaux calciques dépendants du voltage (CCVD)

La famille des canaux calciques dépendants du voltage traduit les dépolarisations membranaires en un influx calcique induisant par la suite, la régulation de fonctions physiologiques très variées au sein de la cellule. Leur activité est essentielle pour coupler les signaux électriques de la surface cellulaire aux événements physiologiques, notamment la transmission synaptique et le couplage excitation-contraction. La membrane plasmique forme un condensateur virtuel isolant deux solutions conductrices, tandis que le canal ionique forme un conducteur. Dans les cellules eucaryotes, la distribution des ions de part et d'autre de la membrane plasmique est inégale. Au repos, l'intérieur des cellules est chargé négativement par rapport à l'extérieur. Le potentiel de membrane, dit de repos, est négatif et varie entre -20 et -90 mV selon le type de la cellule. Lorsque le potentiel de membrane se déplace vers des valeurs plus négatives, on dit que la cellule s'hyperpolarise ; lorsqu'il se déplace vers des valeurs positives, la cellule se dépolarise.

L'électrophysiologie cellulaire constitue une étape essentielle et une approche fonctionnelle qui permet d'étudier l'activité des canaux calciques et de mesurer le courant calcique lors d'une dépolarisation membranaire par potentiel imposé. Effectivement, le développement de la technique du « patch clamp », dans le but de mesurer le courant traversant une cellule complète ou un canal unique, a permis de mettre en évidence la diversité des canaux calciques et d'établir leurs caractéristiques biophysiques et pharmacologiques.

En effet, le principe de base de la technique « patch clamp » consiste à réaliser des sauts de potentiels d'amplitude et de durée variables. A partir d'un potentiel de maintien, proche de celui de repos, on enregistre les courants qui apparaissent lors des sauts du potentiel de diverses amplitudes, appelés potentiels tests, et qui amènent le potentiel de membrane à des valeurs plus négatives. L'intensité des courants enregistrés en fonction de la valeur du potentiel transmembranaire peut ainsi être étudié et mesuré. Une dépolarisation appliquée aux canaux calciques favorise l'ouverture du canal et provoque une apparition d'une succession d'échelons de courant dirigés vers le sens entrant. En configuration cellule entière, le courant global (I_{Ca}) enregistré en fonction du voltage imposé (V_m) présente une allure en cloche caractéristique. D'après la loi d'Ohm, la pente de la courbe I-V est égale à la conductance du canal. La relation I-V indique si le canal est voltage-dépendant, c'est à dire si sa conductance varie selon le potentiel ce qui implique un mécanisme voltage-dépendant de la régulation du courant, intrinsèque au canal.

A l'aide du patch clamp, on peut déterminer d'autres paramètres comme par exemple les cinétiques d'inactivation et d'activation. En fait, les canaux ioniques présentent généralement trois états : un état fermé, un état ouvert et un état inactivé. Dans le cas des canaux calciques dépendants du potentiel à haut seuil, l'activation, passage de l'état fermé à l'état ouvert, a lieu suite à une dépolarisation. L'inactivation, passage de l'état ouvert vers l'état inactivé, a lieu suite à une dépolarisation et/ou une augmentation locale de la concentration en calcium. Les canaux calciques à haut seuil présentent donc une inactivation voltage-dépendante et notamment dépendante du calcium. Pour décrire la dépendance de l'inactivation vis à vis du potentiel, on trace des courbes d'inactivation qui décrivent le rapport canaux activables/canaux inactivés pour chaque potentiel à l'état stable. Ces courbes sont obtenues en appliquant un prépulse d'amplitude variable et assez long pour atteindre l'état stable de l'inactivation puis un pulse test toujours au même potentiel. La courbe représente les courants obtenus lors du pulse test en fonction du potentiel du prépulse correspondant, c'est à dire la quantité de canaux encore activables à la fin du prépulse. Les courants sont normalisés (courant I à un potentiel Em donné sur le courant maximum obtenu I_{max}).

La classification des canaux calciques a été fondée sur des critères électrophysiologiques auxquels se sont rapidement associés des critères pharmacologiques après la découverte de toxines spécifiques (**Tableau 2**) (Catterall, Perez-Reyes et al. 2005).

| Classification pharmacologique et distribution tissulaire des CCDV | | |
|---|---|--|
| Courant | Pharmacologie | Distribution tissulaire |
| Type T | Benzimidazoles (mibéfradil) Amiloride, Éthosuximide Kurtoxine, Nickel | Neurones, cœur, muscles lisses, cellules endocrines, spermatozoïdes |
| Type L | Dihydropyridines (nifédipine) Phénylalkylamines Benzothiazépines | Muscles squelettiques et lisses, neurones, cœur, cellules endocrines, rétine |
| Type N | ω-Conotoxine GVIA ω-Conotoxine MVIIA ω-Agatoxine IIIA | Neurones |
| Type P/Q | ω-Agatoxine IVA ω-Agatoxine IIIA ω-Conotoxine MVIIC | Neurones, cellules pancréatiques |
| Type R | Nickel, Cadmium | Neurones, cellules endocrines |

Tableau 2 : Classification pharmacologique des CCVD

Les études électrophysiologiques ont permis de mettre en évidence l'existence des différents types de canaux Ca^{2+} (**Tableau 3**).

| Sous-unité Ancienne nomenclature | | Sous-unité Nouvelle nomenclature | | Courant calcique |
|-------------------------------------|---------------|-------------------------------------|---------------------|-------------------------------------|
| Famille | Protéine | Famille | Protéine | |
| HVA sensibles aux DHP | α_{1S} | Ca _v 1 | Ca _v 1.1 | I _{CaL} Squelettique |
| | α_{1C} | | Ca _v 1.2 | I _{CaL} Cardiaque |
| | α_{1D} | | Ca _v 1.3 | I _{CaL} Neuroendocrine |
| | α_{1F} | | Ca _v 1.4 | I _{CaL} Rétine |
| HVA insensibles aux DHP | α_{1A} | Ca _v 2 | Ca _v 2.1 | I _{CaP} / I _{CaQ} |
| | α_{1B} | | Ca _v 2.2 | I _{CaN} |
| | α_{1E} | | Ca _v 2.3 | I _{CaR} |
| LVA | α_{1G} | Ca _v 3 | Ca _v 3.1 | I _{CaT} Cerveau |
| | α_{1H} | | Ca _v 3.2 | I _{CaT} Cœur, rein |
| | α_{1I} | | Ca _v 3.3 | I _{CaT} Cerveau |

Tableau 3 : Nomenclature des CCVD

On distingue deux catégories essentielles classées selon leur seuil d'activation : « Low-Voltage-Activated » (LVA) et « High-Voltage-Activated » (HVA). L'activation des canaux LVA se produit à des potentiels membranaires relativement faibles vers -70 mV, et est complètement inactivé lorsque le potentiel de membrane est maintenu à une valeur plus

positive que -50 mV. Alors que les canaux HVA s'activent à des dépolarisations plus élevées entre -40 mV et 10 mV, et ne s'inactivent pas sous le seul effet du potentiel.

1.2 Les récepteurs aux dihydropyridines

Certains canaux calciques dépendant du potentiel (les Ca_v1 , **Tableau 3**) sont connus comme étant sensibles aux dihydropyridines (DHP). Ces canaux sont des complexes multiprotéiques constitués d'une sous-unité α_1 qui forme le pore d'entrée du calcium et de 3 sous-unités auxiliaires $\alpha_2\delta$, β et γ qui modulent l'activité du canal et le transport de la sous-unité α à la membrane. Ces canaux calciques sont caractérisés par une large conductance calcique, une inactivation lente dépendante du potentiel et par une régulation par phosphorylation dont celle dépendante de la PKA. Enfin, ces canaux sont inhibés par les dihydropyridines, les phénylalkylamines et les benzothiazépines.

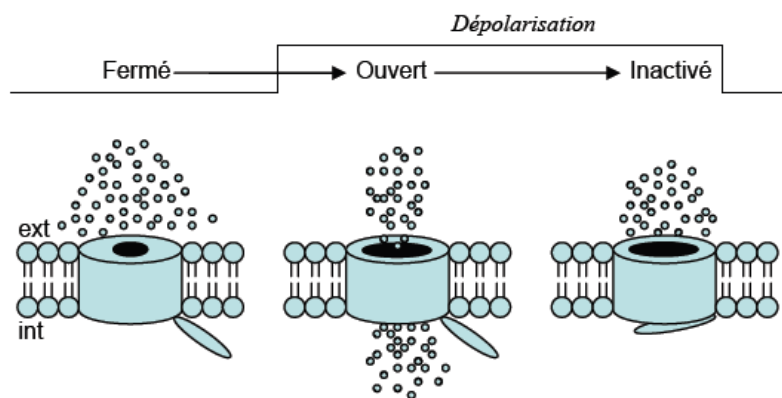


Figure 18 : Représentation schématique des différents états des canaux calciques activés par le voltage. Au potentiel de repos le canal est fermé et ne permet pas le passage d'ions. Lorsque la membrane est dépolarisée, le canal change de conformation et permet le passage d'ions. Par la suite, le passage des ions est bloqué malgré le maintien de la dépolarisation. Le canal est dans un état inactivé. (Charnet, Bourinet et al. 1994)

1.1.1 Structure

Ces canaux calciques sont activés par une forte dépolarisation de la membrane plasmique. Ils participent activement à la physiologie des cellules excitables. En effet, ces canaux ont un rôle dans le plateau du potentiel d'action cardiaque. Ils permettent, par ailleurs, de faire rentrer du calcium. Le calcium étant second messenger permettant l'initiation de bon

nombre de mécanismes cellulaires, ces canaux apparaissent comme des intermédiaires important de l'homéostasie calcique (Catterall 2000).

La structure de la sous-unité α_1 est constituée de quatre domaines répétés et chaque domaine est constitué de six segments transmembranaires (S1 à S6). Comme dans tous les canaux dépendants du potentiel, le segment S4 possède des acides aminés chargés positivement qui constituent les « senseurs au voltage ».

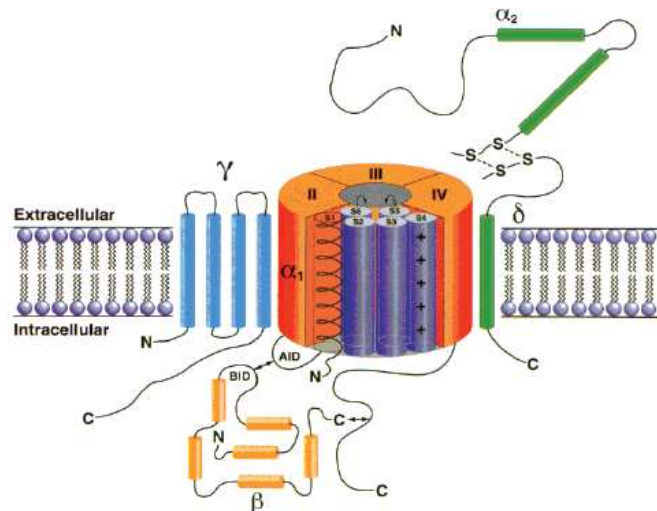


Figure 19 : Représentation schématique de la structure des canaux calciques.

Les canaux calciques sont constitués d'une sous-unité principale α_1 qui constitue notamment le pore du canal. Elle comprend 4 domaines membranaires (I-IV) qui possèdent chacun 6 hélices transmembranaires (S1-S6) relié par des boucles intra et extracellulaires. Des sous-unités auxiliaires peuvent être présentes. La sous-unité β est essentiellement cytosolique et s'associe à la sous-unité α_1 au niveau d'une séquence appelée AID (« Alpha Interaction Domain ») par le biais de sa séquence BID (« Beta Interaction Domain »). La sous-unité γ est membranaire. La sous-unité α_2 - δ possède une partie membranaire et une partie extracellulaire. Pour revue, (Catterall 2000; Catterall, Perez-Reyes et al. 2005)

Les 3 sous-unités auxiliaires (α_2 δ , β et γ) qui interagissent directement avec α_1 par une association stable, ont une capacité à moduler les propriétés biophysiques et/ou l'adressage à la membrane de la sous-unité α_1 :

- **α_2 - δ** : il existe 4 sous-unités génétiquement distinctes α_2 - δ_1 à α_2 - δ_4 . La sous-unité α_2 - δ_1 est l'association la plus répandue. La sous-unité α_2 - δ est le produit d'un seul gène qui subit un clivage post-traductionnel en deux peptides α_2 et δ qui sont ensuite liés par un pont disulfure. La sous-unité α_2 est entièrement extracellulaire alors que δ a une portion transmembranaire et une partie intracellulaire qui permet l'ancrage de la protéine à la membrane. La sous-unité α_2 est la partie qui interagit avec la sous-

unité $\alpha 1$. L'association de la sous-unité $\alpha 2$ - δ à $\alpha 1$ permet l'augmentation de l'adressage de cette sous-unité à la membrane.

- β : Les sous-unités β sont codées par 4 gènes ($\beta 1$ à $\beta 4$). La sous-unité β est la seule sous-unité du canal qui est entièrement cytosolique. Cette sous-unité est importante pour l'adressage de la sous-unité $\alpha 1$ à la membrane ainsi que pour les propriétés biophysiques du canal.

- γ : L'expression des différentes sous-unités γ ($\gamma 1$ à $\gamma 8$) n'affecte pas le nombre de canaux présents à la membrane (Arikkath and Campbell 2003).

1.1.2 Régulation par phosphorylation

Ces canaux DHPR possèdent des sites de régulation par des kinases. La régulation des canaux $Ca_v 1$ par la protéine kinase A (PKA) est une des caractéristiques de ces canaux. La spécificité de la phosphorylation des canaux $Ca_v 1$ par la PKA nécessite la présence des AKAPs (A kinase-anchoring proteins) (Kobayashi, Yamada et al. 2007). Les AKAPs vont lier les substrats de la PKA et ainsi réguler leur phosphorylation. Des études montrent que l'inhibition de la fixation de PKA au $Ca_v 1.2$ diminue la régulation β -adrénergique par la voie PKA dans les myocytes ventriculaires de rat (Hulme, Lin et al. 2003).

Les protéines kinases C (PKC) α , β et γ peuvent se lier de façon directe avec $Ca_v 1.2$ et phosphoryler des régions différentes selon la PKC impliquée. Les canaux $Ca_v 1$ pourraient donc être régulées de façon différente en fonction de la PKC présente (Yang, Liu et al. 2007). Dans des cellules musculaires lisses artériolaires, il existerait des canaux $Ca_v 1.2$ constitutivement actifs car liés à une PKC (Navedo, Amberg et al. 2005).

Le canal $Ca_v 1.2$ pourrait être également phosphorylé par une autre kinase : la protéine kinase G (PKG). La phosphorylation du canal abolit le courant généré par le $Ca_v 1.2$ (Yang, Liu et al. 2007).

1.1.3 Les DHPR dans les cellules non-excitables : les cellules immunitaires

1.1.2.1 Les cellules Natural Killer (Cellules NK)

Les canaux DHPR, présents dans les cellules NK, sont importants pour leur cytotoxicité. En effet, l'utilisation de dihydropyridines empêche le relargage des sérines-estérases, responsables de la cytotoxicité. Mais, l'inhibition des canaux n'a aucun effet sur la fixation des cellules NK à leur cible. (Zocchi, Rubartelli et al. 1998).

1.1.2.3 Les lymphocytes B

Chez le rat, les lymphocytes B expriment un canal de type $Ca_v1.3$ mais n'ayant pas de sensibilité à une dépolarisation membranaire. Ceci suggèrerait un rôle non-pore de ce canal ou que ce canal se trouve dans un état d'activation basal pour permettre un maintien de la concentration de calcium intracellulaire à un niveau nécessaire (Sadighi Akha, Willmott et al. 1996).

Des études, sur des tissus humains, ont montré que ces canaux DHPR ne semblent pas être présents, sous forme native, dans des cellules de lymphome B. En effet, un engagement du BCR induit une augmentation de calcium intracellulaire, inhibée par des dihydropyridines (Grafton, Stokes et al. 2003).

1.1.2.3 Les lymphocytes T

Plusieurs arguments expérimentaux indiquent que des canaux apparentés aux canaux Ca_v1 sont exprimés par les lymphocytes T humains et murins. D'après plusieurs études les canaux exprimés par les lymphocytes ne nécessiteraient pas de dépolarisation de la membrane pour leur activation (Cabral, Paulet et al. 2010).

Une étude sur le rôle des dihydropyridines sur la prolifération des lymphocytes montre le rôle de suppression exercé par ces molécules sur le système immunitaire (Birx, Berger et al. 1984). Par la suite, la littérature s'est enrichie sur ce sujet avec des études fondamentales mais également cliniques. En effet, une étude sur le rôle de la nifedipine sur la prolifération, *ex vivo*, de lymphocytes T montrent une inhibition de prolifération, 30 min post-traitement, associée à une diminution de production d'IL-2. Mais, cet effet inhibiteur semble transitoire car 4 heures après le traitement la prolifération redevient normale (Morgano, Pierri et al. 1990). Cette publication est confortée par une étude, chez la souris, sur l'effet de la nifédipine sur la prolifération, *in vivo*, des lymphocytes T (Kotturi, Carlow et al. 2003). Mais, les résultats semblent contradictoires sur les isoformes des canaux présents dans le lymphocyte T (Kotturi, Carlow et al. 2003; Stokes, Gordon et al. 2004).

Par ailleurs, l'activation par du PMA de cellules T induit l'activation de la PKC. Mais cette activation peut être levée par un traitement aux dihydropyridines (Savignac, Badou et al. 2001). Par conséquent, ces canaux, et leur expression, semblent donc être spécifiques des lymphocytes T et plus précisément de ceux de type Th2. Cette étude est confortée par des études *in vivo* montrant le rôle des canaux $Ca_v1.2$ et $Ca_v1.3$ dans la production d'IL-4 par les lymphocytes T (Savignac, Gomes et al. 2004). Ces études montrent le rôle de ces canaux dans

les mécanismes d'activation des cellules T par une activation du canal par phosphorylation par l'intermédiaire de la PKC.

1.1.2.2 Les cellules dendritiques

La littérature est assez pauvre sur le rôle des canaux calciques dans la physiologie de la cellule dendritique. Dans ce domaine, une seule publication fait référence (Poggi, Rubartelli et al. 1998). En effet, les canaux de type Ca_v1 interviendraient dans l'endocytose et la production d'IL-12 par les cellules dendritiques humaines. En effet, un traitement à la nifedipine induit une réduction de l'endocytose de Dextran et de la production de l'IL-12. De plus, les sous-unités régulatrices du canal, comme la sous-unité $\beta1$ est présente dans ce type cellulaire. Enfin, ces canaux semblent indépendants d'une activation par une dépolarisation membranaire.

1.3 Le mécanisme SOCE

Outre les canaux dépendants du potentiel (paragraphe précédent), les voies d'entrée du Ca^{2+} dans la cellule sont variées. Parmi elle, une voie prédomine dans les cellules non-excitables comme celles du système immunitaire : SOCE (Store Operated Calcium Entry) (Putney 1986). Cette entrée est un mécanisme faisant intervenir les stocks intracellulaires de Ca^{2+} (essentiellement ceux du RE).

L'activation de récepteurs membranaires va induire un influx massif de Ca^{2+} dans la cellule. Ce type d'influx est majoritaire dans les cellules immunitaires (Vig and Kinet 2007). Ce phénomène peut être observé dans le lymphocyte T suite à l'activation du TCR (Donnadieu, Bismuth et al. 1992). Cet influx de Ca^{2+} provoque un courant appelé I_{CRAC} (Calcium-Release Activated-Calcium). Ce courant fut étudié pendant quelques dizaines d'années sans en connaître les entités moléculaires impliquées.

1.3.1 Exemple de mécanisme SOCE : l'activation du TCR

Le calcium joue un rôle essentiel dans l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes T. L'activation du TCR va entraîner la fixation du calcium à la calmoduline qui va à son tour activer la phosphatase calcineurine. La calcineurine va déphosphoryler le facteur de transcription NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) qui va pouvoir traverser la membrane nucléaire pour atteindre le noyau et permettre la transcription des gènes cibles

comme les gènes des cytokines. Le calcium joue un rôle important dans la régulation de l'expression de nombreux gènes importants pour la différenciation des lymphocytes T (**figure 20**). La comparaison de lymphocytes T de patients SCID (syndrome d'immunodéficience sévère combinée) qui ont un défaut de signalisation calcique et un défaut de translocation de NFAT nucléaire avec ceux de sujets sains démontre que 75% des gènes modulés au cours de l'activation des lymphocytes T sont dépendants du calcium (Feske, Giltneane et al. 2001). Le calcium peut être considéré comme un second messenger. La régulation de l'homéostasie calcique permet la régulation des fonctions cellulaires.

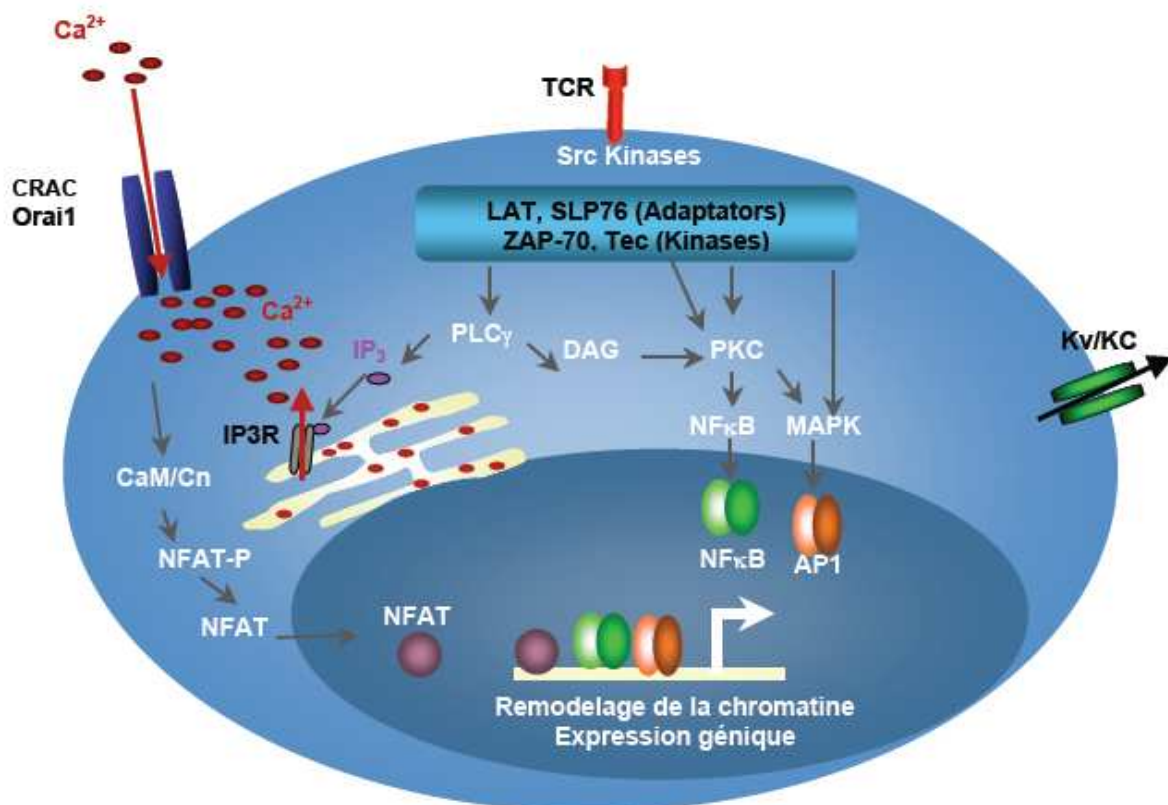


Figure 20 : Voies de signalisation schématisées dans les LT. TCR : Récepteur des lymphocytes T ; PI3K : Phosphoinositide 3 kinase ; PLCg : phospholipase C γ ; PKC : protéine kinase C ; IP3 : inositol triphosphate ; CRAC : Calcium released activated calcium channels ; CaMK : calmoduline kinase ; NFAT : nuclear factor of activated T cells.

Plusieurs réponses cellulaires différentes vont dépendre du calcium. Il existe plusieurs canaux, récepteurs, pompes au niveau de la membrane plasmique et à la membrane des organelles dans le cytosol ; plusieurs kinases et phosphatases vont être impliquées ; tous ces éléments participant à la mise en place de la réponse calcique font partie d'une « boîte à outil du calcium » (Berridge, Bootman et al. 2003). Les réponses cellulaires spécifiques sont

vraisemblablement dues à des signaux calciques bien précis. Les signaux calciques sont caractérisés par l'amplitude et la fréquence des variations de concentration calcique et leur localisation spatio-temporelle.

1.3.2 Le mécanisme SOCE proprement dit

La phospholipase C γ (PLC γ) activée permet la synthèse d'inositol triphosphate (IP₃) et de diacylglycérol (DAG) par le clivage du phosphatidyl inositol biphosphate (PIP₂). L'IP₃ en se fixant sur son récepteur à la surface du réticulum endoplasmique, va permettre le relargage du calcium par les canaux récepteur à l'IP₃ et ainsi libérer les stocks intracellulaires de calcium. Dans les lymphocytes T (LT), la vidange des stocks calciques va permettre l'ouverture d'un canal de la famille des SOC (Store operated calcium channels).

L'activation va permettre l'entrée de calcium extracellulaire dans la cellule. L'augmentation de la concentration du calcium intracellulaire va induire l'activation de la calcineurine, une phosphatase, qui en déphosphorylant le facteur de transcription NFAT va permettre sa translocation au noyau et induire la transcription de plusieurs gènes codants pour des interleukines importantes pour la différenciation et la fonction des lymphocytes T. Le DAG va activer les protéines kinases C (PKC), mais peut aussi augmenter l'activité de la PLC γ et la production de l'IP₃ déclenchant des oscillations de la concentration calcique dans certains types cellulaires, comme par exemple les astrocytes (Hisatsune, Nakamura et al. 2005).

Dans le système immunitaire, une augmentation de Ca²⁺ intracellulaire permet une régulation pointue de processus clés comme la production de cytokines, la présentation antigénique chez les CPAs (Cellules Présentatrices d'Antigène) (Matzner, Zemtsova et al. 2008) ou la formation de la synapse immunologique chez les lymphocytes (Lioudyno, Kozak et al. 2008). Cette augmentation de Ca²⁺ intracellulaire va entraîner l'activation de facteurs de transcription comme NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells), AP-1 ou NF- κ B (Vig and Kinet 2009). Cependant, l'activation de NFAT nécessite une réponse calcique faible et soutenue dans le temps, alors que l'activation d'AP-1 et NF- κ B nécessitent une réponse forte et transitoire (Dolmetsch, Lewis et al. 1997; Dolmetsch, Xu et al. 1998). Par ailleurs, si AP-1 et NF- κ B peuvent être activés par des voies indépendantes du Ca²⁺, NFAT semble être hautement dépendant du Ca²⁺ car la translocation nécessite une étape strictement catalysée par le Ca²⁺ : l'activation par le complexe calcineurine/calmoduline (Gwack, Feske et al. 2007).

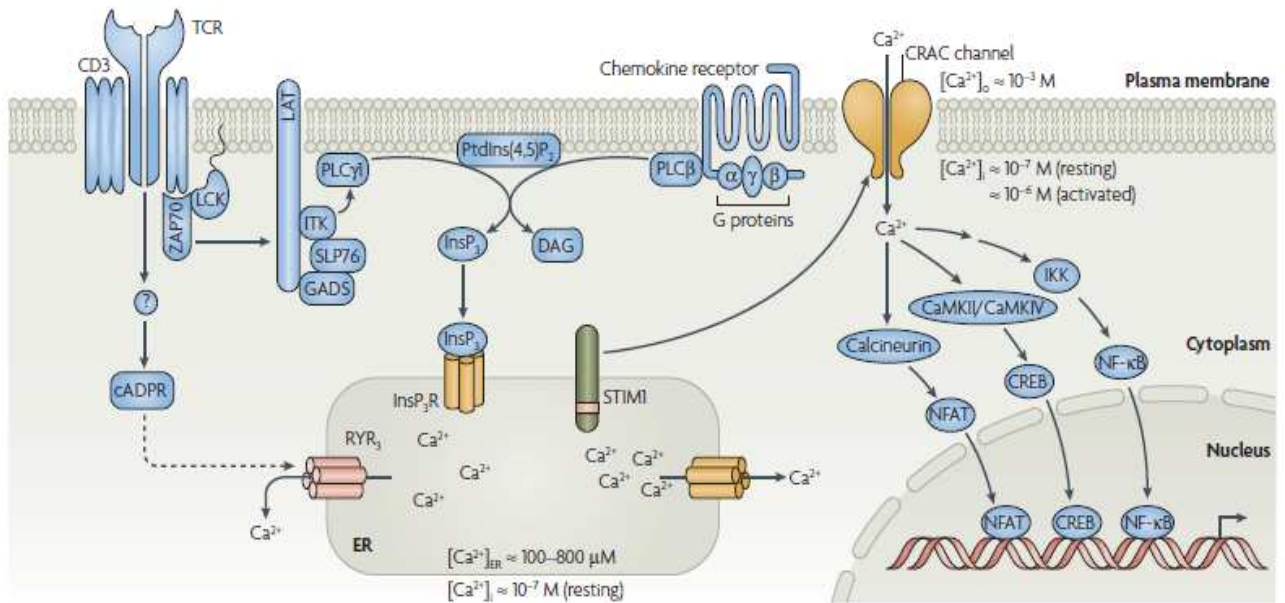


Figure 21 : Mécanisme SOCE dans l'activation du TCR L'activation du TCR va induire l'activation de la PLCγ qui va hydrolyser le PIP₂ en IP₃ et DAG. L'IP₃ va se fixer sur son récepteur. Cette liaison va induire la vidange des stocks calciques du RE qui va être intégré comme un signal d'activation des protéines STIM-1. STIM-1 va, ar la suite, activer les canaux CRAC de la membrane plasmique dont ORAI-1.(Feske 2007)

En 2006, un nouveau partenaire, expliquant le phénomène de SOCE, a été caractérisé et cloné par Vig *et al.* : ORAI-1, responsable du courant I_{CRAC}. Cette découverte tardive doit être due à la très faible homologie de structure et de séquence de cette protéine avec les autres canaux calciques connus (Vig, Beck et al. 2006).

1.4 Les canaux CRAC : le complexe ORAI/STIM/CRACR2A

Il est connu que de nombreux mécanismes cellulaires sont régulés par le Ca²⁺ intracellulaire. Dans la plupart de ces phénomènes, nous observons une augmentation de cette concentration intracellulaire. L'origine de ce calcium est multiple : intra et extracellulaire. En effet, bien que le RE soit une réserve intracellulaire consécutive de Ca²⁺, sa capacité est assez limitée. Mais ces mécanismes de vidange du RE peuvent induire l'ouverture de canaux de la membrane plasmique, responsables de l'influx de Ca²⁺ provenant du milieu extracellulaire : **l'influx capacitif de Calcium**. Ces canaux sont appelés des SOC (Store-Operated Channels) ou canaux CRAC (Calcium Released Activated-Calcium).

En 1986, J. Putney a émis l'hypothèse de la présence d'un influx de Ca²⁺ extracellulaire résultant de la vidange des stocks calciques du RE (Putney 1986). Par la suite,

Hoth et Penner (1992) ont démontré que cet influx capacitif est responsable du courant I_{CRAC} sur des mastocytes (Hoth and Penner 1992). Mais, il a fallu attendre une vingtaine d'années pour identifier les entités moléculaires responsables de ce courant.

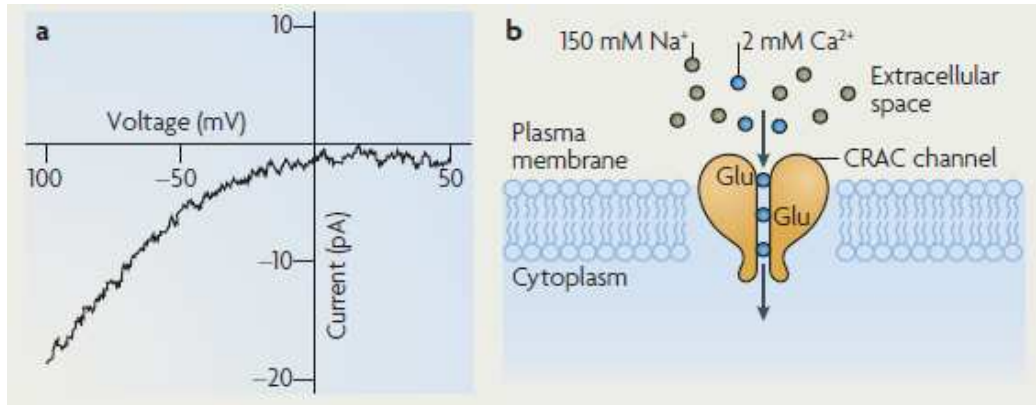


Figure 22 : Caractéristiques du canal et du courant CRAC Ce canal est responsable des influx calciques des cellules non-excitables telles que les cellules immunitaires. Le courant I_{CRAC} (a), rectifiant entrant pour des potentiels négatifs, résulte de son activité. Ce canal (b) présente une forte sélectivité au Ca^{2+} , une faible conductance unitaire (moins de 1pS) et une inactivation rapide et dépendante du Ca^{2+} . (Feske 2007)

1.4.1 CRACM1 / ORAI1 : le canal CRAC, proprement dit

En 2006, trois équipes (Feske, Gwack et al. 2006; Vig, Beck et al. 2006; Zhang, Yeromin et al. 2006) ont publiées la structure moléculaire de la protéine responsable du courant I_{CRAC} . Leurs approches de criblage par ARN interférent (RNAi) sur des cellules de *Drosophila* ont révélé la présence d'une structure multimérique formant un canal dans la membrane plasmique. Ces RNAi du génome complet de *Drosophila melanogaster* ont été testé sur leur capacité à inhiber l'influx calcique, induit par la vidange des stocks réticulaires par l'action de la Thapsigargine (TG), ou sur la translocation du facteur de transcription NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells). La TG, qui inhibe l'ATPase calcique du RE ou SERCA (Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase), induit une fuite passive de Ca^{2+} du RE vers le cytoplasme. La protéine membranaire nommée ORAI-1 (ou CRACM1 pour CRAC Modulator 1) fut alors clonée.

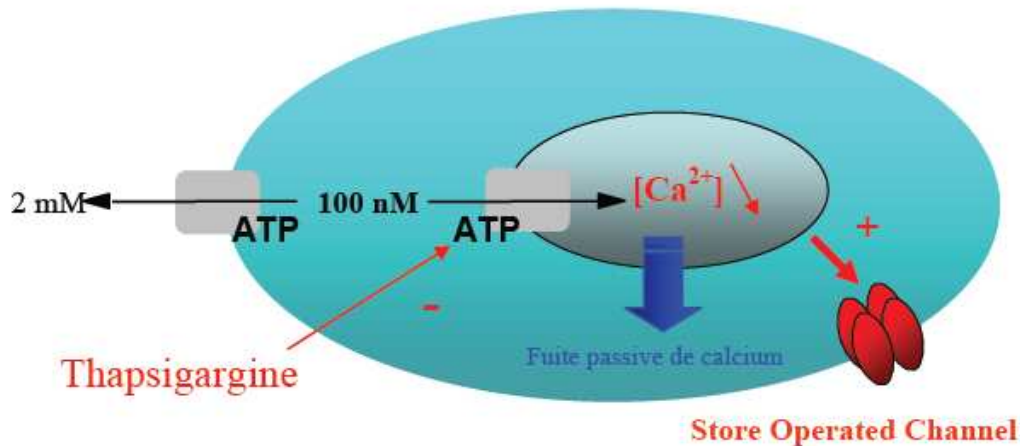


Figure 23 : Mode d'action de la thapsigargine. La thapsigargine inhibe les ATPases de type SERCA responsable du repompage du calcium vers le réticulum. La concentration en calcium chute dans le réticulum ce qui permet d'activer les canaux SOC.

Par cette même approche de RNAi, Feske *et al.* (2005 et 2006) découvrirent l'homologue humain et montrèrent l'implication de mutations de la protéine humaine ORAI-1 dans le syndrome d'immunodéficience sévère combinée (SCID)(Feske, Prakriya *et al.* 2005; Feske, Gwack *et al.* 2006). Ces patients avaient été caractérisés en 1994 par l'équipe du Pr A. Fisher par l'absence d'influx calcique dans leurs lymphocytes T (Partiseti, Le Deist *et al.* 1994; Le Deist, Hivroz *et al.* 1995).

ORAI-1 est une protéine de 37,2 kDA possédant quatre domaines transmembranaires avec des parties N- et C-terminale dans le cytosol (Vig, Beck *et al.* 2006). Elle est exprimée à la membrane plasmique des cellules excitables mais également des non-excitables. Il existe deux protéines homologues chez l'homme et chez la souris : ORAI-2 et ORAI-3 (Varnai, Hunyady *et al.* 2009). Leurs propriétés semblent être semblables à celles de ORAI-1 cependant leurs fonctions sont encore mal connues (**Figure 24**). En effet, l'équipe de M. Trebak a démontré un recrutement préférentiel de la protéine ORAI-3 dans les influx calciques des cellules cancéreuses, possédant des récepteurs aux œstrogènes, par rapport à celles sans récepteur à œstrogènes (recrutement de ORAI-1) (Motiani, Abdullaev *et al.* 2010).

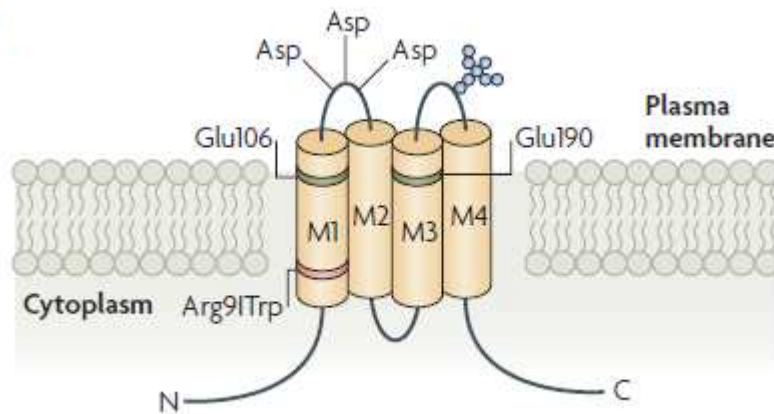


Figure 24 : ORAI-1, le canal CRAC ORAI-1, protéine membranaire, comporte 4 domaines TM (M1 à M4). La seconde boucle extracellulaire comporte un site de glycosylation. Les 2 résidus glutamate, Glu 106 et 109, sont impliqués dans la sélectivité et la perméabilité au Ca^{2+} , chez l'homme et la souris. La mutation du résidu Arginine (Arg), en position 91, en Tryptophane (Trp) est responsable du syndrome d'immunodéficience (SCID) chez l'homme. (Feske 2007)

ORAI-1 est une molécule homo-tétramérique (Mignen et al., 2008) et des mutations de certains résidus, telles que Glu106Ala et Arg91Trp, entraînent un changement de sélectivité et de perméabilité du canal pour d'autres ions (Prakriya, Feske et al. 2006; Vig, Beck et al. 2006).

1.4.2 STIM-1: le "signal d'alarme" calcique

Prakriya *et al.* (2006) ont démontré une action synergique d'ORAI-1 (pore du canal CRAC) avec une protéine intracellulaire, de la membrane réticulaire : STIM-1 (Stromal Interaction Molecule 1)(Prakriya, Feske et al. 2006).

L'identification de cette protéine (Liou, Kim et al. 2005; Roos, DiGregorio et al. 2005) a permis d'appréhender les mécanismes de régulation du courant I_{CRAC} . Chez les mammifères, deux homologues (STIM-1 et STIM-2) sont retrouvés, avec 61% d'homologie. STIM-1 et STIM-2 sont des molécules d'environ 77 kDa possédant un seul domaine transmembranaire. Ces protéines sont principalement exprimées dans la membrane du RE (environ 80%) et possèdent, en N-terminal, un domaine EF-hand permettant la liaison au Ca^{2+} et un domaine SAM permettant la formation en « cluster ». Ces deux domaines se situent dans la lumière réticulaire (ou dans le cytosol si STIM-1 est exprimée sur la membrane plasmique).

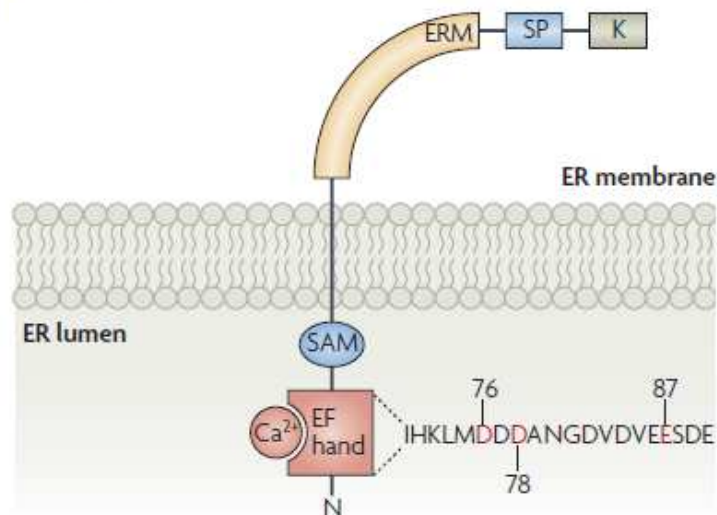


Figure 25 : STIM-1, le « senseur » calcique du RE STIM-1, située principalement dans la membrane réticulaire (environ 80%), ne possède qu'un seule domaine transmembranaire mais un motif EF-hand en N-terminal contenant des résidus essentiels pour son rôle de « senseur » calcique (D76, D78 et E87). STIM-1 possède également un domaine SAM (Sterile α -Motif), un domaine de type « coiled-coil », subdivisé en ERM domaine (Ezrin, Radixin and Moesin), une région riche en sérine et proline (SP) et une région riche en Lysine (K) (Muik et al., 2008) (Feske 2007)

Un domaine « coiled-coil » est retrouvé en C-terminal, permettant des interactions protéiques avec des protéines cytoplasmiques ou de la membrane plasmique (Putney 2005; Luik, Wu et al. 2006). Grâce à ces EF-hands, STIM-1 possède une grande sensibilité à la concentration calcique du RE. En effet, suite à une vidange des stocks calciques du RE, une relocalisation de STIM-1 sous la membrane plasmique, voire une interaction avec cette dernière est observée (Liou, Kim et al. 2005; Zhang, Yu et al. 2005). Ce rôle de « senseur » calcique semble prendre une part important dans la genèse du courant I_{CRAC} . En effet, des expériences de mutagénèse des acides aminés responsables de la fixation du Ca^{2+} , dans les domaines EF-hands, deux équipes ont montré une activation du courant I_{CRAC} et ce, de façon constitutive (Huang, Zeng et al. 2006; Luik, Wu et al. 2006). Depuis quelques mois, une nouvelle molécule a été découverte et permet une régulation précise de l'activité du complexe ORAI-1/STIM-1 responsable du courant I_{CRAC} : CRACR2A (Srikanth, Jung et al. 2010).

1.4.3 CRACR2A : le modulateur du complexe CRAC

Une approche en spectrométrie de masse a permis l'identification d'une protéine régulatrice du complexe moléculaire CRAC : CRACR2A (CRAC Regulator 2A). Cette protéine, de 45 kDa, possède un homologue chez l'homme et la souris, CRACR2B. Ces deux homologues sont exprimés dans le cytosol et auraient la même fonction, avec des expressions cellulaires éventuellement différentes. CRACR2A aurait un site d'interaction directe avec le complexe ORAI / STIM qui se dissocierait en présence de fortes concentrations calciques, et ceci grâce au motif EF-hand de sa partie N-terminale.

CRACR2A

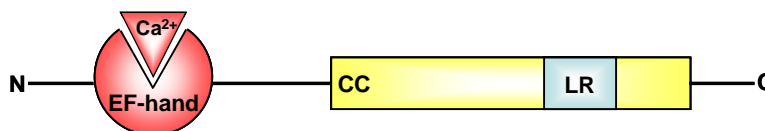


Figure 26 : CRACR2A, le modulateur du complexe moléculaire CRAC La structure prédictive de CRACR2A comporte un motif EF-hand en N-terminal, un domaine de type « coiled-coil » (CC) avec une région riche en Leucine (LR) en C-terminal. (Adapté de (Srikanth, Jung et al. 2010))

De plus, l'utilisation de RNAi et de mutagenèse dirigée montre que CRACR2A s'associe à STIM-1 et ORAI-1 après le premier signal calcique provenant du RE (soit une concentration calcique moyenne d'environ 200 nM). Des mutations du domaine EF-hand provoqueraient une apoptose précoce de la cellule après activation. En effet, l'absence de régulation de la concentration intracellulaire en Ca²⁺ va induire l'activation de l'apoptose. Une forte concentration intracellulaire en Ca²⁺ induit une apoptose par activation de la voie des caspases. Tous ces résultats suggèrent que cette protéine stabiliserait le complexe ORAI-1 / STIM-1 après activation.

1.4.4 Mécanisme d'activation du courant I_{CRAC}

Les trois molécules décrites précédemment apparaissent comme les principaux partenaires du complexe moléculaire d'activation du courant I_{CRAC}. A l'état basal, le RE est chargé en Ca²⁺ (entre 400 et 800 nM de Ca²⁺ libre), STIM-1 est sous forme de dimères stabilisés par les domaines « Coiled-Coil » (Dziadek and Johnstone 2007; Baba, Nishida et al. 2008) (**Figure 27a**). Ces dimères peuvent être formés indépendamment par les deux

homologues de la protéine (STIM-1 ou STIM-2). La partie N-terminale, intra-luminale, formerait des monomères car les propriétés des domaines SAM-EF-hand isolés forment de tels monomères aux concentrations de Ca^{2+} similaires (Cahalan 2009). Suite à l'activation cellulaire, une vidange des stocks calciques est observée, *via* la voie des phosphoinositides (**Figure 27b**). Quand la concentration calcique intra-réticulaire est inférieure à 300nM, STIM-1 s'oligomérisse rapidement en complexe multimérique (Liou, Fivaz et al. 2007; Muik, Frischauf et al. 2008) par l'intermédiaire de son domaine SAM (Stathopoulos, Zheng et al. 2008; Stathopoulos, Zheng et al. 2009). Cette oligomérisation précède et permet la translocation de STIM-1 vers des régions de jonction entre RE et membrane plasmique. Ce rapprochement permet la formation de points de regroupement appelés « puncta », situés dans la membrane du RE, lui-même situé entre 10 et 25 nm de la membrane plasmique (Wu, Buchanan et al. 2006).

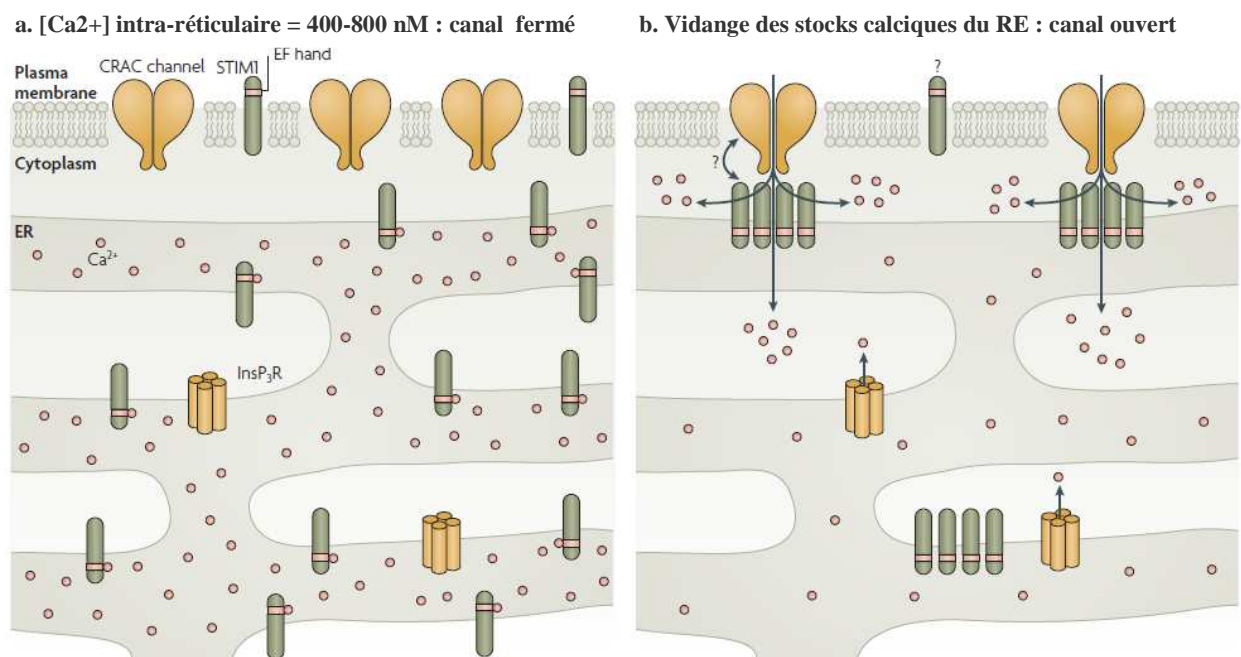


Figure 27: Activation du courant I_{CRAC} a. La concentration intracellulaire est comprise entre 400 et 800 nM, les protéines STIM-1 sont sous forme de monomère dans la membrane du RE. Le canal CRAC ou SOCs est alors fermé. Lors de la vidange du RE, induite par l'activation des IP₃R, une « clusterisation » des protéines STIM-1 est observée. Cette formation de « puncta » va entraîner une ouverture du canal CRAC, *via* une interaction physique (Feske 2007)

Par ailleurs, la formation de ces « puncta » semble être dépendante des stimuli. En effet, dans une lignée de mastocytes de rat (RBL), la TG induit une formation de « puncta » de l'ordre du micromètre et à longue durée de vie. La formation de « puncta » est transitoire sans pour autant qu'une variation d'amplitude de l'influx calcique soit observée (Calloway, Vig et al. 2009). Cependant, cette agrégation de protéines STIM-1 est rapidement réversible par la recharge des stocks calciques. Une controverse existe sur les mécanismes de translocation de cette protéine, à la membrane plasmique. En effet, il semblerait que les microtubules interviennent pour permettre la migration intra-cytoplasmique du RE *via* une interaction avec STIM-1. Cependant, dans des systèmes de surexpression, le réseau de microtubules ne paraît pas indispensable à l'agrégation de STIM-1 ni à l'activation du courant en résultant (Smyth, DeHaven et al. 2007).

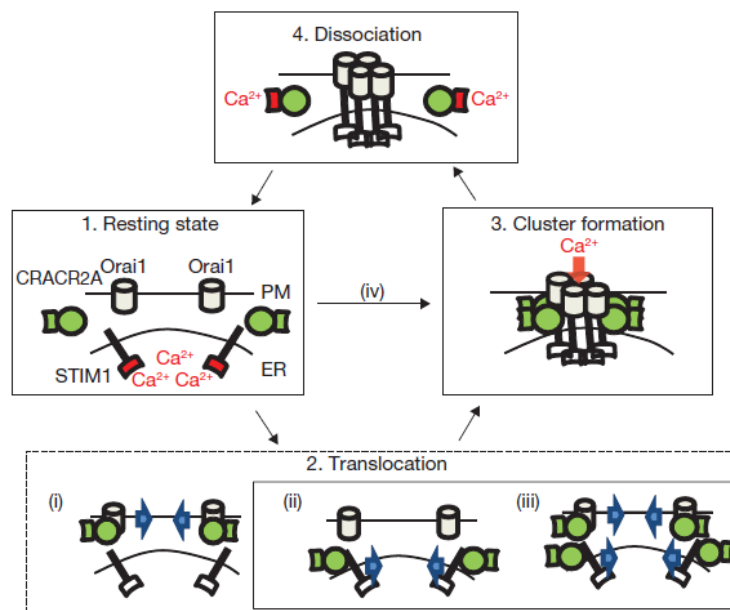


Figure 28 : Mécanisme d'action du modulateur CRACR2A Dans des conditions d'état basal, ORAI-1 et STIM-1 sont distribuées, respectivement, à la membrane plasmique et celle du RE (1), alors que CRACR2A (en vert) est localisé dans le cytosol. Après la déplétion des stocks calciques du RE, ORAI-1 et STIM-1 sont transloqués sous forme de « clusters » à des endroits de jonctions entre la membrane plasmique et le RE (2). Les domaines EF-hand sont indiqués en rouge sur le schéma, quand le Ca^{2+} y est lié. ((Srikanth, Jung et al. 2010))

De plus, cette agrégation des protéines STIM-1 permettrait l'interaction de ces « puncta » avec des protéines ORAI-1 de la membrane plasmique. En effet, STIM-1 ne serait pas seulement le transducteur de la vidange calcique mais permettrait également la

multimérisation d'ORAI-1, formant ainsi le pore actif du canal (Luik, Wu et al. 2006; Penna, Demuro et al. 2008) STIM-1 possède les mêmes capacités d'activation des différents homologues de la protéine ORAI (Lis, Peinelt et al. 2007). Les courants en résultant ont les mêmes caractéristiques électrophysiologiques. Récemment, grâce à l'utilisation de technique de la technique de « photo-bleaching » en microscopie à fluorescence, Ji *et al.* (2008) a montré qu'au minimum deux molécules de STIM-1 sont nécessaires à l'activation du canal (Ji, Xu et al. 2008). *A contrario*, il faudrait quatre molécules d'ORAI-1 pour former le pore du canal fonctionnel (Luik, Wu et al. 2006; Ji, Xu et al. 2008). Même si ORAI-1 semble être stable en dimère (Gwack, Srikanth et al. 2007), des tétramères ont été retrouvés dans certains modèles cellulaires, et ceci sans activation (Ji, Xu et al. 2008).

Enfin, le modulateur CRACR2A (**Figure 28**) pourrait être impliqué dans la translocation d'ORAI-1 (i) et STIM-1 (ii) mais également des deux associés (iii). De plus, il serait possible que ce modulateur interagisse passivement avec ORAI-1 et STIM-1 au niveau des sites de jonction (iv). Par conséquent, il apparaîtrait que CRACR2A est un intermédiaire important pour la stabilisation du complexe ORAI / STIM (**3**). En réponse à l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule, CRACR2A va lier le Ca^{2+} grâce à son domaine EF-hand. Il en résultera donc une dissociation des complexes ORAI / STIM (**4**). Ce mécanisme, encore hypothétique, serait retrouvés dans les lymphocytes T et les fibroblastes.

1.5 Les canaux TRP

Avant la découverte du complexe ORAI / STIM, une famille de canaux cationiques TRP (Transient Receptor Potential), la plupart sélectif au Ca^{2+} , fut largement étudiée pour leur éventuelle implication dans les mécanismes d'entrée capacitive de Ca^{2+} . Ces canaux font partie d'une superfamille de canaux à six domaines transmembranaires perméables aux cations qui se tréamérisent pour former un canal fonctionnel. En outre, la classification des TRP repose sur leur homologie de séquences avec le premier canal découvert (chez un mutant de drosophile appelé « TRP »). Ainsi, 28 canaux ont été répartis en sept familles (Montell and Rubin 1989) : - TRPC pour Canonical (7 membres)

- TRPV pour Vanilloïd (6 membres)
- TRPM pour Melastatin (8 membres)
- TRPP pour Polycystin (3 membres)
- TRPML pour Mucolipin (3 membres)
- TRPA pour Ankyrin (4 membres)
- TRPN pour No mechanoreceptor potential C (non exprimés chez les mammifères)

Grâce à leur diversité d'activation et de sélectivité, la superfamille des TRP interviendrait dans de nombreux mécanismes cellulaires à la fois dans les cellules excitables et non-excitables. C'est pourquoi, nous prendrons, comme exemple, le rôle de cette superfamille dans la régulation calcique du lymphocyte T.

En effet, il existe trois familles de canaux TRP : Les TRPC (canonical transient receptor potential) qui fonctionneraient comme homo ou hetero-tétramères; les TRPM (melastatin related TRP) et TRPV (vanilloïd receptor related TRP). Les TRPV5 et TRPV6 sont les canaux les plus sélectifs au calcium dans la famille des TRP (Hoenderop, Nilius et al. 2005).

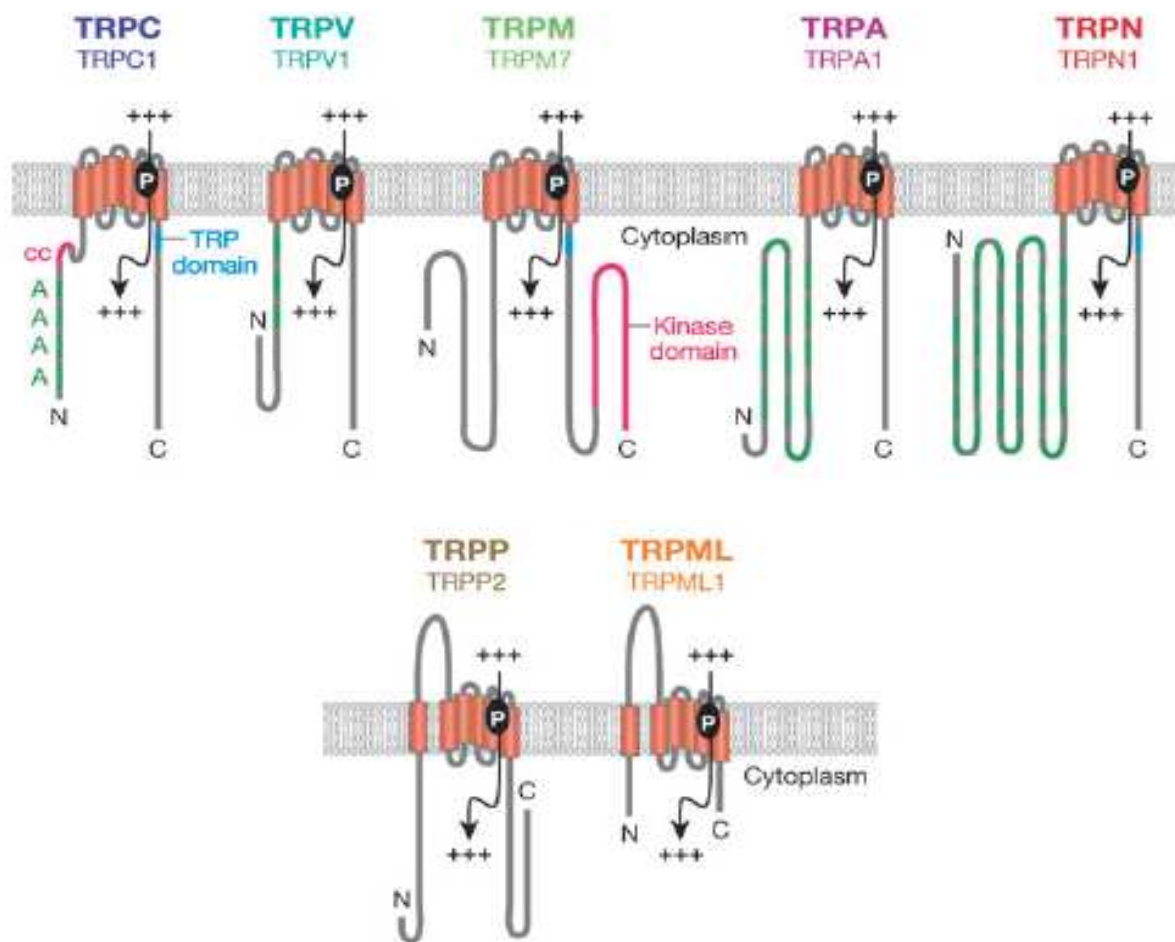


Figure 29 : Les différentes familles de TRP et leur structure D'après (Venkatachalam and Montell 2007)

De nombreuses études sur la régulation des TRPC montrent des résultats parfois contradictoires. Selon certaines études les canaux TRPC sont régulés soit par la PLC via le diacylglycérol (DAG) soit par la déplétion des stocks intracellulaire de calcium (Putney 2004). Cette deuxième caractéristique a fait que pendant longtemps les canaux TRP ont été décrits comme faisant partie des SOC. Le canal le plus étudié est le TRPC3. La génération de différents mutants de lymphocytes Jurkat a permis la caractérisation de ces cellules ayant un défaut pour le courant calcique via les SOC (Fanger, Hoth et al. 1995). Ces cellules ont été utilisées dans une autre étude, qui a conclu qu'une mutation de TRPC3 serait responsable de ce défaut (Philipp, Strauss et al. 2003). En effet, lorsque ces cellules sont transfectées avec une forme sauvage de TRPC3, la signalisation calcique induite par le TCR est restaurée. Bien que le rôle des canaux TRP comme canal, activé par la déplétion des stocks soit tombé dans l'oubli suite à la découverte des protéines ORAI et STIM, il est tout à fait possible que ces

canaux participent activement au contrôle de la régulation calcique dans les lymphocytes T à la fois au repos et lors de leur stimulation.

De plus, TRPC3 possède un site de fixation au complexe Ca^{2+} /calmoduline et le complexe est fixé dans les conditions de repos. Le récepteur à l'IP3 de type 3 (IP3R3) est capable de se fixer à TRPC3 et activer celui-ci. Les sites de fixation du complexe Ca^{2+} /Calmoduline et celui du récepteur à l'IP3 de type 3 sont les mêmes. De façon intéressante il a été montré que lors de l'activation de TRPC3 le récepteur à l'IP3 de type 3 va se fixer sur TRPC3, empêchant la fixation du complexe Ca^{2+} /Calmoduline et permettre ainsi l'activation de TRPC3 (Zhang, Tang et al. 2001).

TRPM4 a été décrit comme important dans la signalisation des lymphocytes T. L'inhibition moléculaire de TRPM4 endogène dans les lymphocytes T conduit à une augmentation soutenue du calcium à la place des oscillations. TRPM4 agirait en concert avec les canaux SOC, les Kv1.3 et les KCa pour contrôler les oscillations de calcium dans les lymphocytes. TRPM4 permettrait, dans les cellules non-excitables, de maintenir une force électromotrice réduite afin de permettre l'entrée de Ca^{2+} par les canaux CRAC (Launay, Cheng et al. 2004).

TRPV6 a été décrit comme pouvant être inactivé par l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytoplasmique. Le flux calcique de TRPV6 active la PLC ce qui résulte dans la formation d'IP3 et l'inactivation de TRPV6. TRPV6 agirait comme un senseur au Ca^{2+} quand la concentration de Ca^{2+} est faible, le canal sera ouvert et permet son entrée dans la cellule. Le canal va se fermer lorsque la concentration est élevée de façon à limiter l'entrée de Ca^{2+} ((Thyagarajan, Lukacs et al. 2008).

2. Les canaux potassiques : les régulateurs de grandes fonctions cellulaires

2.1 Généralités

Parmi les canaux ioniques, les canaux sélectifs pour l'ion K^+ constituent la famille la plus vaste et la plus diversifiée des canaux ioniques. En effet, il existe environ 70 gènes clonés codant des canaux perméables au K^+ . Dans les cellules non-excitables, ils contribuent

par exemple, à l'homéostasie du K^+ , à la régulation du volume cellulaire, au contrôle du potentiel de membrane et participent au couplage stimulation-sécrétion.

Les canaux K^+ sont des complexes protéiques qui permettent le passage sélectif des ions K^+ au travers de la membrane plasmique. La concentration intracellulaire des ions K^+ étant plus élevée que la concentration extracellulaire, l'ouverture de ces canaux se traduit par un efflux de K^+ de la cellule. Cette sortie d'ions, chargés positivement, entraîne un déplacement du potentiel électrique de la membrane (E_m) vers des valeurs négatives. Au repos, les membranes plasmiques des cellules sont principalement perméables au K^+ et par conséquent, la valeur du potentiel de repos est proche de E_K dans de nombreuses conditions physiologiques.

Les canaux K^+ sont exprimés de façon ubiquitaire au sein de l'organisme. Ils jouent un rôle majeur dans l'homéostasie du K^+ et plus généralement dans les fonctions physiologiques associées à une variation du potentiel de membrane, comme la transmission synaptique, la contraction musculaire ou la libération d'hormone (Hilles, 1992). L'importance physiologique de l'activité de ces canaux K^+ est soulignée par le nombre croissant de maladies génétiques auxquelles ils sont associés, appelées canalopathies.

L'électrophysiologie, et notamment la technique du « patch-clamp » ont rendu possible l'étude des canaux ioniques dans leur environnement natif. Ces études ont révélé l'existence d'une grande diversité de courants K^+ aux propriétés fonctionnelles et pharmacologiques distinctes. Cette diversité fonctionnelle repose essentiellement sur une étonnante diversité génétique.

Ces différents canaux K^+ ont un motif commun de structure conservé et appelé domaine P, correspondant au pore du canal, qui participe à la formation du filtre de sélectivité pour l'ion K^+ (**Figure 30**). Toute mutation de ce domaine entraîne soit un changement de sélectivité soit une perte totale d'activité des canaux.

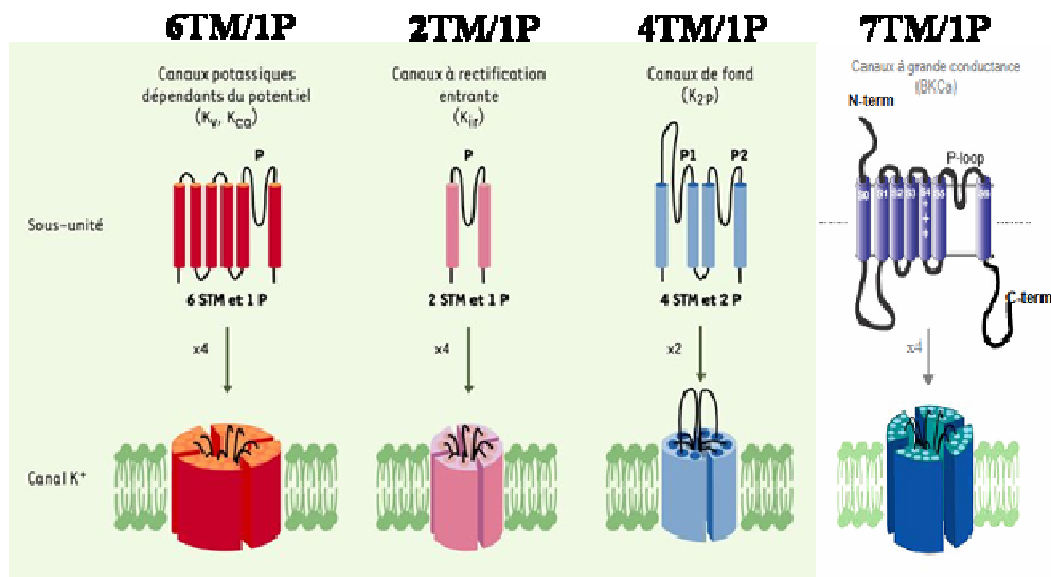


Figure 30 : Motifs structuraux des différents canaux potassiques et leurs précurseurs présumés. TM = segments transmembranaires; P = pore. Modifiée d'après (Girard and Lesage 2004)

Les canaux K^+ sont répartis en quatre grandes classes selon leurs homologies structurales et leurs propriétés biophysiques (Gutman, Chandy et al. 2003):

- Les canaux à six domaines trans-membranaires (6TM) incluant les canaux K_v et les canaux KCa (SKCa et IKCa). L'extrémité N- et C-terminale sont intracellulaires et le pore du canal (région P) est formé par les segments trans-membranaires 5 et 6. Le canal fonctionnel résulte de l'association de quatre sous-unités α à 6TM/1P. Ces canaux K_v peuvent s'associer à une sous-unité β régulatrice.
- Les canaux à deux domaines trans-membranaires (2TM) rassemblent, les canaux K^+ à rectification entrante (K_{ir}), les canaux K^+ sensibles à l'ATP (K_{ATP}) et les canaux K^+ couplés aux protéines G (Doupnik, Lim et al. 1995). L'extrémité N et C-terminale sont cytoplasmiques, le pore du canal se situe entre les deux segments trans-membranaires et il faut quatre sous-unités à 2TM/1P pour former un canal fonctionnel. Le canal K_{ATP} est constitué de l'association de 4 sous-unités α de K_{ir} et de 4 sous-unités des récepteurs aux sulfonyles.

- Les canaux à deux domaines pores (K_{2P}) contrairement aux autres canaux K^+ , ceux sont des dimères de sous-unités à quatre segments trans-membranaires à deux domaines pores (4TM/2P) situés entre les segments 1/2 et 3/4.
- Les canaux à sept domaines trans-membranaires (7TM), comme les canaux K^+ de grande conductance (BKCa, *B pour Big*). Le canal fonctionnel est un tétramère de sous-unités 7TM/1P mais contrairement aux autres canaux l'extrémité N-terminale est extracellulaire. Les sous-unités α , à 7TM, constituant le pore du canal BKCA peuvent être associées à une sous-unité β régulatrice. Cette sous-unité possède deux segments trans-membranaires reliés par une boucle extracellulaire. Les extrémités N- et C-terminales sont intracellulaires.

2.2 les canaux potassiques activés par le calcium intracellulaire

2.2.1 Phylogénie et généralités sur les KCA

Comme nous l'avons vu précédemment, les KCA appartiennent à la famille des canaux à 6TM/1P (Gutman, Chandy et al. 2003; Stocker 2004). Etant donné la diversité des canaux KCa et des canaux K^+ en générale, une nomenclature *KCN* (*K⁺ Channel Nomenclature*) développée par HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee), basée sur le nom des gènes codant pour chacune des sous-unités protéiques constituant les canaux K^+ a été établie (<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/kcn.php>). En parallèle, selon la nomenclature IUPHAR (International Union of Pharmacology), les KCa ont été regroupés en deux grands groupes selon leurs homologies et leurs propriétés fonctionnelles (Wei, Gutman et al. 2005). On distingue dans un premier groupe, les canaux K^+ de petites conductances activés par le Ca^{2+} (SKCA), regroupant les KCa2.1, 2.2, 2.3 (*KCNN1*, 2, 3 ou SK1, 2, 3) (Kohler, Hirschberg et al. 1996), et les canaux K^+ de conductances intermédiaires activés par le Ca^{2+} KCa3.1 (*KCNN4* ou SK4 ou IK1, I pour Intermediate) (Ishii, Silvia et al. 1997; Joiner, Wang et al. 1997). Ces canaux ne sont pas dépendants du voltage et sont activés par de faibles concentrations de Ca^{2+} intracellulaire ($< 1 \mu M$). Les trois conductances SKCa (SK1, 2, 3) sont bloquées par l'apamine, une toxine issue du venin d'abeille *Apis Mellifera*, à des concentrations de 100 pM à 10 nM, permettant, selon la concentration utilisée, de distinguer les différentes conductances entre elles. Les KCa de conductances intermédiaires et de petites conductances jouent un rôle majeur dans les mécanismes de signalisation

dépendants du Ca^{2+} que se soit au niveau des cellules excitables ou non. Cette famille de KCa possède, au niveau de la région C-terminale de chaque sous-unité, un site de fixation au Ca^{2+} , la calmoduline (Xia, Fakler et al. 1998; Fanger, Ghanshani et al. 1999), véritable senseur au Ca^{2+} . La fixation du Ca^{2+} sur la calmoduline induit un changement de conformation de cette dernière, permettant d'activer le canal.

| HGNC | IUPHAR | Autre noms | Sous-unités | Toxine/bloqueurs |
|---------|--------|-------------------|-------------|--|
| KCNMA1 | KCa1.1 | BKCa, Slo, Slo1 | α | Ibériotoxine (1,7nM) Charybdotoxine (2,9nM) |
| KCNMB1 | | hSlo-beta, beta-1 | β | |
| KCNMB2 | | beta-2 | β | |
| KCNMB3 | | beta-3 | β | |
| KCNMB3L | | | β | |
| KCNMB4 | | beta-4 | β | |
| KCNN1 | KCa2.1 | SKCa1, SK1 | α | Non sensible à l'apamine |
| KCNN2 | KCa2.2 | SKCa2, SK2 | α | Apamine (60pM) |
| KCNN3 | KCa2.3 | SKCa3, SK3 | α | Apamine (1nM) Charybdotoxine (5nM) |
| KCNN4 | KCa3.1 | IKCa1, SK4 | α | TRAM-34 (10nM) Clotrimazole (4,7 μ M) |
| KCNT1 | KCa4.1 | Slack, Slo2.2 | α | |
| KCNT2 | KCa4.2 | Slick, Slo2.1 | α | |
| KCNU1 | KCa5.1 | Slo3 | α | |

Tableau 4 : Nomenclature et caractéristiques pharmacologiques des KCa. Les concentrations indiquées entre parenthèses représentent les IC_{50} des toxines. Nomenclature et pharmacologie des KCA : HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee ; IUPHAR : International Union of Pharmacology).

Ces canaux KCa sont retrouvés au niveau du système nerveux central mais aussi dans beaucoup de types cellulaires de la périphérie, comme les cellules musculaires, les cellules glandulaires ou les lymphocytes T (Grissmer, Nguyen et al. 1993). Parmi les KCa, un groupe se distingue : les canaux SKCa, qui peuvent être subdivisé en deux sous-groupes. En effet, les canaux SK1, SK2 et SK3, sensibles à l'apamine, possèdent de petite conductance (entre 4 et 14pS) (Park 1994) alors que le canal SK4, insensible à l'apamine, possède une conductance plus importante (environ 45pS) (Ishii, Silvia et al. 1997; Joiner, Wang et al. 1997).

De plus, une légère rectification entrante, sur les enregistrements de courant SK, a été mise en évidence pour des potentiels dépolarisés (Kohler, Hirschberg et al. 1996; Potier, Joulin et al. 2006). La sensibilité au Mg^{2+} du canal pourrait expliquer ce phénomène même si le mécanisme moléculaire n'est pas encore élucidé actuellement. Cet ion régulerait à la fois la probabilité d'ouverture et de fermeture du canal SK, au même titre que le Ca^{2+} (Lancaster, Nicoll et al. 1991).

Par ailleurs, les canaux SKCa ne sont pas sensibles à l'Ibériotoxine (IbTx, toxine de venin de scorpion), bloqueur spécifique du canal KCa1.1. Si l'IbTx est très spécifique de ce dernier, la Charybdotoxine (ChTx) possède la capacité de bloquer d'autres KCa que le KCa1.1 : le canal KCa3.1. C'est cette sensibilité à la ChTx et l'insensibilité à l'IbTx et à l'apamine qui fut pendant longtemps reconnues comme caractérisant le canal KCa3.1. Mais depuis le début des années 2000, un inhibiteur spécifique a été développé pour ce canal (Wulff, Miller et al. 2000).

Enfin, ces canaux SK sont activés par le Ca^{2+} intracellulaire à une concentration de l'ordre de la micromole. Pour des canaux natifs, une activité d'environ 50% de ces canaux est observé pour des concentrations en Ca^{2+} intracellulaire entre 400 et 800 nM (Grissmer, Nguyen et al. 1993).

2.2.1 Rôles physiologiques des KCa

Les canaux KCa ont été retrouvés dans de nombreux tissus, aussi bien au niveau central que périphérique. Mais leur rôle n'est pas encore totalement caractérisé. Un des canaux le plus étudié est le canal KCa1.1. Ainsi, les canaux ioniques sensibles au Ca^{2+} servent à réguler le potentiel de membrane mais peuvent également avoir d'autres implications dans les fonctions des DC humaines. Des canaux de ce type ont déjà été observés dans d'autres cellules immunes, comme le macrophage (Gallin 1984), les polynucléaires neutrophiles (Ahluwalia, Tinker et al. 2004) et éosinophiles (Saito, Sato et al. 1996). Certaines études

montrent un rôle des canaux potassiques sensibles au Ca^{2+} présents dans différents types cellulaires. Dans le lymphocyte T, le canal SK4 aurait un rôle dans la prolifération de la cellule T qui survient lors de son activation par les cellules présentatrices d'antigène.

L'étude de Saito *et al.*, (1996) montre la relation entre la chimiokine CCL5 et le canal potassique sensible au Ca^{2+} dans les polynucléaires éosinophiles. Cette chimiokine, importante dans la migration de ce type cellulaire, serait capable d'activer les canaux potassiques sensibles au Ca^{2+} présents à la surface de la cellule par le biais de protéines G. La chimiokine CCL5 est également importante dans la migration de la DC immature.

Lors de l'activation T par une cellule présentatrice d'antigène, un influx calcique est observé suite à l'engagement du TCR (Fomina, Fanger et al. 2000; Cahalan, Zhang et al. 2007). Ce Ca^{2+} va, en plus de son action sur le facteur de transcription NFAT, activer le canal potassique dépendant du Ca^{2+} KCa3.1 (SK4 ou IKCa) qui en créant un efflux potassique permet de maintenir l'influx calcique. Ces événements ioniques sont indispensables à la bonne activation du lymphocyte T (Fanger, Hoth et al. 1995).

Au niveau des tissus périphériques, et plus particulièrement au niveau vasculaire, les canaux KCa2.3 ont été largement étudiés (Kohler, Kreutz et al. 2001; Burnham, Bychkov et al. 2002). La présence de ces canaux influence grandement les fonctions vasculaires. Ainsi, une inhibition totale ou partielle de la sensibilité à l'apamine va induire des modifications de tonus vasculaire (Taylor, Bonev et al. 2003). Dans les cellules endothéliales vasculaires, ces canaux induisent une hyperpolarisation de la membrane de ces cellules ; laquelle sera communiquée aux cellules musculaires lisses adjacentes par l'intermédiaire de jonctions *gap* myo-endothéliales (Sandow, Tare et al. 2002) ou par libération d'EDHF (Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor) (Campbell, Gebremedhin et al. 1996; Matoba, Shimokawa et al. 2000). Cette hyperpolarisation va s'opposer à la dépolarisation et à la vasoconstriction, résultant de l'activation des récepteurs α -adrénergiques. Le degré d'expression des canaux KCa2.3 est en relation avec cette vaso-régulation. Par ailleurs, ces canaux ont été retrouvés au niveau des cellules musculaires lisses de la vessie. En effet, leur rôle résiderait dans le contrôle de l'amplitude et la fréquence des contractions phasiques de la vessie (Herrera, Pozo et al. 2003).

De plus, la migration cellulaire est une des grandes fonctions d'un grand nombre de cellules. Et cette migration met en jeu la machinerie complexe du cytosquelette. L'activité de ce dernier est corrélée à la fonction des canaux ioniques. En effet, la restauration du volume cellulaire des cellules *via* les canaux ioniques est complètement abolie lorsque le turn-over

des filaments d'actine est pharmacologiquement perturbée (Lang, Busch et al. 1998). De façon réciproque, la modulation des canaux ioniques va induire des modifications de volume cellulaire ainsi que des perturbations de polymérisation et dépolymérisation de ces filaments d'actine. En effet, la réduction du volume cellulaire est corrélée à la formation de filaments d'actine (Schwab, Reinhardt et al. 1999). Ces phénomènes de variation de volume cellulaire suggèrent que ces canaux ioniques et les filaments d'actine jouent un rôle important dans les processus de migration cellulaire (Mitchison and Cramer 1996). Par ailleurs, la concentration des ions nécessaires au bon fonctionnement de la machinerie du cytosquelette est contrôlée par l'activité des canaux ioniques, et par conséquent, il n'est pas étonnant que des mécanismes de régulation de la migration cellulaire font intervenir des canaux ioniques. De plus, ce canal va jouer un rôle sur la prolifération de cellules cancéreuses. L'étude de Roger *et al.* (2004) montre un rôle de courants sensibles à l'IbTx sur la prolifération de cellules normales et cancéreuses mammaires (MDA-MB231...). L'activation de ce courant, résultant d'une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} , augmente la prolifération de cellules mammaires. Ce courant est observé dans tous les types de cellules épithéliales mammaires, ce qui suggère qu'il n'est pas la conséquence de la transformation cancéreuse (Roger, Potier et al. 2004). Par ailleurs, une étude démontre le rôle de ce canal KCa1.1 sur le cycle cellulaire. En effet, les cellules cancéreuses MCF-7 expriment les canaux KCa et essentiellement le canal KCa1.1. Ce dernier ne semblerait pas impliqué dans la prolifération de ce type cellulaire mais son activité serait liée à la progression de ces cellules dans le cycle cellulaire (Ouadid-Ahidouch, Roudbaraki et al. 2004).

De plus, les canaux KCa1.1 sont exprimés de manière ubiquitaire dans divers types cellulaires issus de tumeurs du cerveau (Kraft, Benndorf et al. 2000; Ransom and Sontheimer 2001)). L'activation des canaux KCa1.1 est déclenchée par une dépolarisation membranaire et renforcée par une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire (Toro, Wallner et al. 1998). Les récepteurs induisant les oscillations calciques sont probablement ceux permettant l'activation des BKCa (Reetz and Reiser 1996; Bordey, Sontheimer et al. 2000) et ces fluctuations calciques sont connues pour moduler la migration des cellules neuronales (Komuro and Rakic 1996). Ainsi, les canaux KCa1.1 ne sont pas seulement impliqués dans la modulation du signal calcique mais jouent aussi un rôle dans la migration de cellules tumorales issues de gliome. En effet, l'activation des canaux KCa1.1 est connue pour inhiber la migration des cellules cancéreuses nerveuses (Kraft, Krause et al. 2003). Une fois activés, les KCa1.1 vont hyperpolariser la membrane des cellules éloignant le potentiel de membrane du seuil

d'activation des canaux calciques dépendants du voltage (VOC : Voltage Operated Channel) et donc diminuer l'entrée du Ca^{2+} . Les canaux KCa1.1 ne sont pas les seuls canaux KCa intervenant dans le processus de migration cellulaire. En effet, il a été mis en évidence que les canaux IKCa auraient un rôle dans la migration des cellules de mélanome et des cellules épithéliales rénales transformées (Schwab, Wojnowski et al. 1994; Schwab, Schuricht et al. 1999). L'absence d'une protéine se liant à l'actine (ABP-280) inhibe la migration des cellules humaines de mélanomes ainsi que leur capacité à activer des canaux K^+ régulant leur volume cellulaire (Cunningham, Gorlin et al. 1992; Cantiello, Prat et al. 1993). Les canaux IKCa ne sont pas exprimés dans le SNC mais le sont dans la plupart des autres tissus ou organes. Ils ont été retrouvés dans les cellules du colon (Warth, Hamm et al. 1999), les fibroblastes (Schwab, Wulf et al. 2006), les cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires (Kohler, Wulff et al. 2003), les cellules pancréatiques cancéreuses (Jager, Dreker et al. 2004) et des cellules épithéliales mammaires cancéreuses (Ouadid-Ahidouch, Roudbaraki et al. 2004). Enfin, les canaux KCa2.3 sont également connus pour gouverner la migration de cellules cancéreuses. En effet, une étude montre que l'inhibition de l'expression de ces canaux, par la technique d'ARN interférence, inhibe la migration de cellules cancéreuses mammaires (Potier, Joulin et al. 2006).

3. Le Calcium dans les cellules immunitaires

Le rôle du Ca^{2+} dans les cellules immunitaires a été décrit depuis de nombreuses années (essentiellement sur le lymphocyte T). Cependant, dans les cellules non-excitables, la vision du rôle de l'homéostasie calcique restait limitée par manque d'entités moléculaires connues permettant une entrée de Ca^{2+} dans la cellule. Dans les années 2000, la mise en évidence du mécanisme SOCE, au niveau moléculaire, a permis d'élargir considérablement les domaines de recherche.

3.1 Les mastocytes

3.1.1 L'activation dépendante des Immunoglobulines de type E

La régulation de l'homéostasie a d'abord été étudiée dans les mastocytes (Parekh and Penner 1997). En effet, la liaison des immunoglobulines de type E (IgE) à son récepteur engendre une activation de la $\text{PLC}\gamma$ via des protéines adaptatrices (telles Syk, LAT...) (Baba and Kurosaki 2009). Cette $\text{PLC}\gamma$ va provoquer la vidange des stocks calciques au travers de la voie des phosphoinositides. La décharge de ces stocks réticulaires va activer le courant I_{CRAC} par le complexe ORAI / STIM. Par ailleurs, les mastocytes ne présentent pas d'altération du développement, *in vitro* comme *in vivo*, en l'absence des molécules ORAI-1 et STIM-1. Cependant, les mastocytes déficients en STIM-1 et ORAI-1 ont une capacité de dégranulation fortement altérée. Cette altération de dégranulation réduit fortement la réponse immune induite par l'activation du récepteur aux IgE (Baba, Nishida et al. 2008 ; Vig, DeHaven et al. 2008).

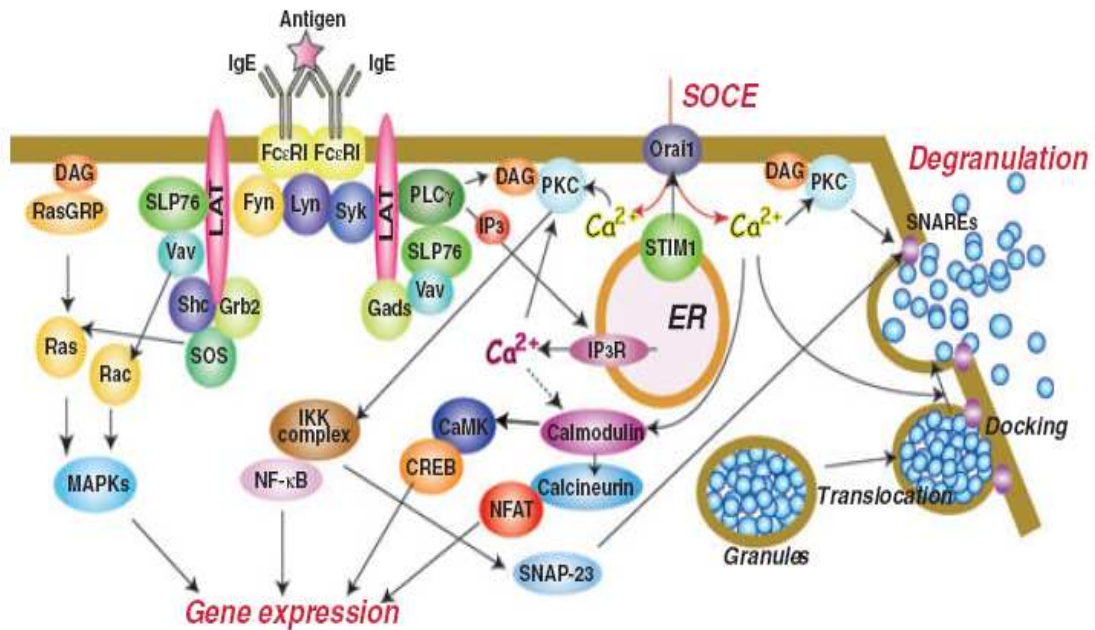


Figure 31 : Activation de la dégranulation du mastocyte par les IgE
 L'activation des FcγR par les IgE va induire une vidange des stocks calciques du RE, via l'activation de la PLCγ. Cette vidange des stocks calciques va induire l'activation du canal ORAI-1 par l'intermédiaire de la protéine réticulaire STIM-1. Ce Ca²⁺, entrée par cette ECC, va activer des protéines de signalisation pour induire l'expression de gènes cibles. (Baba and Kurosaki 2009)

Ainsi, ce mécanisme de dégranulation du mastocyte semblerait sous la dépendance stricte du courant I_{CRAC} (**Figure 31**).

3.1.2 La migration mastocytaire

Pour permettre l'induction d'une réponse immunitaire adaptée, les cellules immunitaires doivent posséder une capacité de migration : soit vers le site de l'inflammation, soit vers les organes lymphoïdes secondaires (OLS). Pour cela, les cellules suivent des gradients de chimiokines. Les récepteurs à ces chimiokines sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires, couplés aux protéines G (GPCR) (Ridley, Schwartz et al. 2003). L'activation de ces récepteurs va entraîner une activation de la PLC, entre autre voie. Cette dernière va alors provoquer le clivage de PIP₂ en IP₃ et DAG, ce qui va engendrer une entrée massive de Ca²⁺, résultant d'une décharge des stocks calciques du RE (Baggiolini, Dewald et al. 1997 ; Floto, MacAry et al. 2006). Cet influx calcique semble intervenir dans les processus

de migration d'autres types cellulaires : les neutrophiles (Pettit and Fay 1998) et les cellules dendritiques (Randolph, Ochoa et al. 2008).

3.2 Les neutrophiles

3.2.1 L'activation des neutrophiles : la phagocytose

Peu d'études ont été menées sur l'homéostasie calcique dans le neutrophile. Le Ca^{2+} a encore un rôle hypothétique mais non négligeable. En effet, une activation du complexe $Fc\gamma RIIIa / Fc\gamma RIIIb$ et *via* l'IL-8 entraînent une augmentation transitoire de la concentration intracytoplasmique de Ca^{2+} , dans des neutrophiles humains (Edwards, Watson et al. 1997 ; Edberg, Moon et al. 1998). Cependant, la phagocytose serait gouvernée par des voies de signalisation dépendantes ou non du Ca^{2+} extracellulaire (Lew, Andersson et al. 1985) (**Figure 32**).

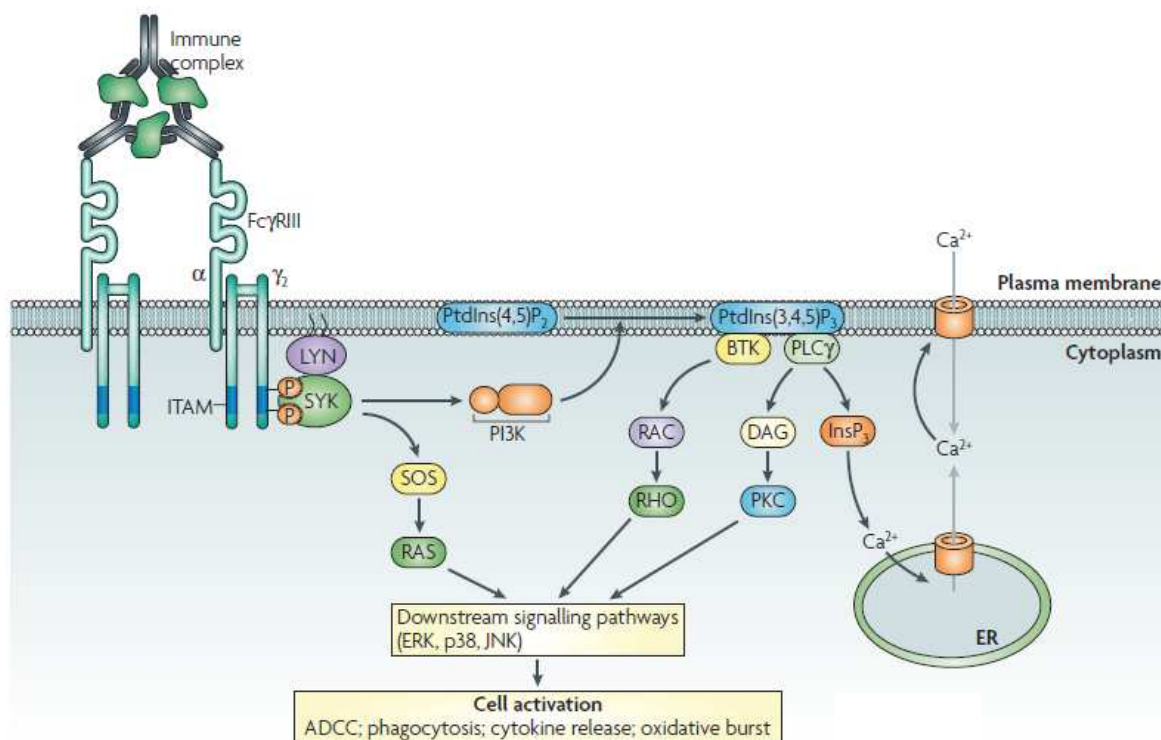


Figure 32 : $Fc\gamma RIII$: Activation dépendante du Ca^{2+} dans les neutrophiles et les macrophages L'activation des $Fc\gamma RIII$ par un complexe immunitaire va induire une vidange des stocks calciques du RE, *via* l'activation de la $PLC\gamma$. Cette vidange des stocks calciques va induire l'activation d'un canal SOC (Store-Operated Channel). (Nimmerjahn and Ravetch 2008)

3.2.2 *La migration des neutrophiles*

La migration des neutrophiles est sous la dépendance de filaments de myosine. En effet, des études de phosphorylation ont montré qu'en présence d'un chélateur calcique (intracellulaire), la phosphorylation de la myosine de type II était diminuée, ce qui empêche la rétraction des uropodes et par conséquent la migration cellulaire (Eddy, Pierini et al. 2000). Le rôle du Ca^{2+} dans la migration des neutrophiles, et probablement des cellules immunitaires en général, ne serait pas limité à l'activation de récepteurs membranaires mais pourrait contrôler des mécanismes plus généraux comme l'initiation des forces de traction dues à la myosine de type II et requise pour les mouvements cellulaires.

3.3 Les monocytes et les macrophages

Ces deux types cellulaires sont très proches et ont été souvent étudiés en parallèle. Cependant, la documentation sur le rôle du Ca^{2+} dans ces cellules est assez pauvre. Cependant, tout comme dans les neutrophiles, STIM-1 semble avoir un rôle essentiel dans la signalisation des $\text{Fc}\gamma\text{R}$. En effet, chez la souris chimérique reconstituée avec de la moelle osseuse issue d'une souris STIM-1 déficiente, les macrophages péritonéaux montrent une diminution de la capacité de phagocytose, induite par l'activation des $\text{Fc}\gamma\text{R}$ *via* le mécanisme SOCE (Braun, Gessner et al. 2009). Par conséquent, même si ces résultats restent très discutés dans la littérature, le Ca^{2+} extracellulaire jouerait un rôle central dans la phagocytose dépendante des IgG. Cependant, des animaux ou patients déficients pour STIM-1 pourraient être résistants à des pathologies dépendantes des IgG. Il existe d'autres voies d'entrée du Ca^{2+} dans le macrophage. En effet, une application d'ATP sur des macrophages murins entraîne un fort influx calcique *via* les récepteurs purinergiques P2X7. Le courant résultant de l'ouverture de ces canaux est responsable de la synthèse de cytokines telles que l'IL-1 β (Pelegriin and Surprenant 2009).

3.4 Les lymphocytes T et B

L'activation du TCR ou du BCR induit un influx calcique. En effet, le Ca^{2+} est connu pour réguler de nombreux processus tels que la prolifération et la mobilité des lymphocytes ou la dégranulation des lymphocytes cytotoxiques (Negulescu, Shastri et al. 1994 ; Pipkin and Lieberman 2007). En 2001, Lewis émet l'hypothèse que le courant I_{CRAC} serait responsable de

cet influx calcique, en réponse à l'activation du TCR. Cependant, d'autres canaux, exprimés par les lymphocytes, peuvent être responsables de cet influx calcique : les récepteurs purnergiques P2X ou les canaux TRPC, TRPV et TRPM (Putney 1986; Scharenberg, Humphries et al. 2007).

Par ailleurs, des études, en système d'expression ou sur des souris, ont permis d'étudier le rôle de ORAI et STIM des lymphocytes T et B. Cependant, des problèmes restent encore à éclaircir. En effet, les souris déficientes pour ORAI-1 ou STIM-1 meurent prématurément *post-partum* ou *in utero*. C'est pourquoi la plupart des études ont été réalisées sur des souris irradiées et ensuite reconstituées avec des cellules de foie fœtal ou dans des systèmes d'inactivation de gène tissu-spécifique.

3.4.1 L'activation du TCR

Suite à l'engagement du TCR, l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} va provoquer l'arrêt du lymphocyte et permettre la formation d'une synapse immunologique avec la cellule présentatrice d'antigène (CPA) (**Figure 33**). En l'absence d'une haute affinité du récepteur pour l'antigène et d'un signal de co-stimulation, le signal calcique est de moindre amplitude avec une faible fréquence (Wei, Safrina et al. 2007).

Au contraire, un signal avec une haute affinité va entraîner un influx calcique de forte amplitude et de longue durée, ce qui permettra la différenciation du lymphocyte T naïf en divers types de lymphocytes T effecteurs. Ce type de signal va entraîner, en absence de signal de co-stimulation, une différenciation en lymphocyte T anergique (Hogan, Chen et al. 2003). Enfin, il existe des modulateurs de cet influx calcique. En effet, les canaux K_v 1.3 et KCa 3.1 (canaux potassiques, respectivement, dépendants du potentiel et sensibles à la concentration intracellulaire de Ca^{2+}) vont faire sortir du potassium et donc hyperpolariser la membrane ce qui entraînera une augmentation de la « driving-force » pour le Ca^{2+} de l'influx capacitif (Chandy, DeCoursey et al. 1984 ; Chandy, DeCoursey et al. 1986 ; Chandy, Wulff et al. 2004).

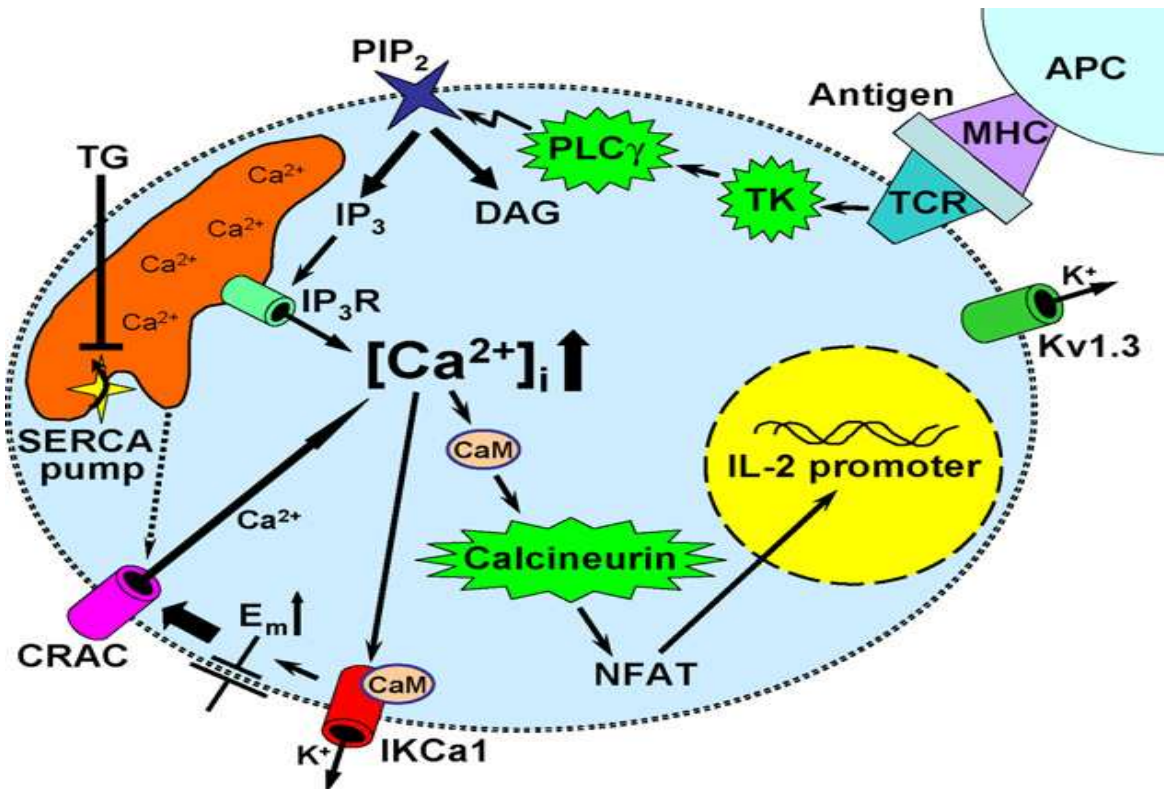


Figure 33 : Signal calcique résultant de l'activation du TCR (Cahalan, Zhang et al. 2007)

De plus, certains canaux vont inhiber cet influx calcique : le TRPM4 (canal sensible à la concentration intracellulaire de Ca^{2+} , essentiellement sélectif pour le sodium) va entraîner une entrée de sodium dans la cellule et, par conséquent, va diminuer cette « driving-force » pour le Ca^{2+} , par dépolarisation de la membrane plasmique, et donc diminuer la quantité de Ca^{2+} entrant dans la cellule (Launay, Cheng et al. 2004).

3.4.2 L'activation du BCR

Le signal calcique du lymphocyte B est en grande partie comparable à celui de la cellule T. En effet, aucune altération du développement du linéage B n'est observée dans des souris déficientes pour ORAI-1. Cependant, suite à l'activation de cette population B, par l'engagement du BCR, un défaut de prolifération est observé dans ces populations déficientes en ORAI-1. Par ailleurs, des études *in vitro* ont montré que l'activation par le LPS de cellules B, déficientes en ORAI-1, n'induit aucune altération de prolifération. On peut donc dire que l'influx calcique, et par conséquent le courant I_{CRAC} en résultant, gouverne la prolifération dépendante de la présentation antigénique (Gwack, Srikanth et al. 2007; Vig, DeHaven et al. 2008).

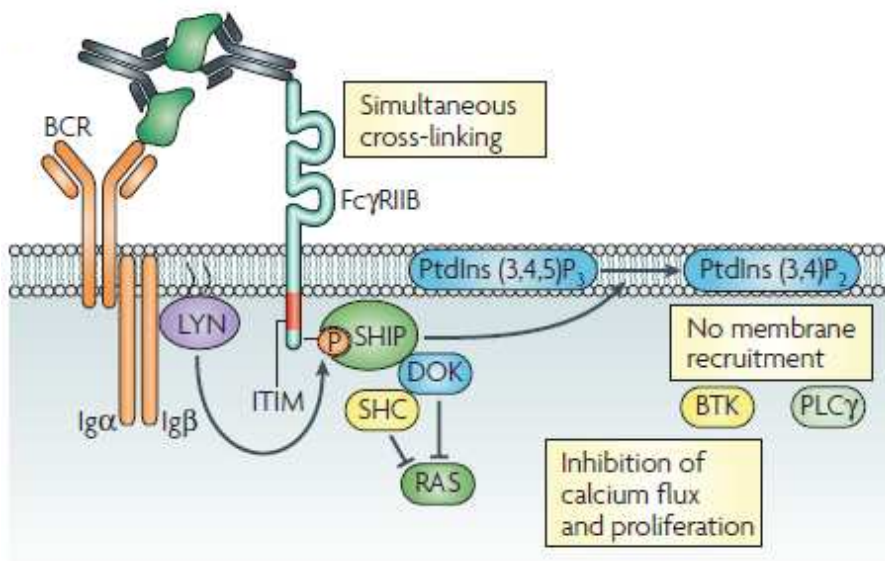


Figure 34 : Inhibition du signal calcique induit par l'engagement du BCR par le FcγRIIb (Nimmerjahn and Ravetch 2008)

De même, le signal calcique, induit par l'activation du BCR, est aboli dans les cellules B déficientes en STIM-1 (Morita, Tanimura et al. 2009). En outre, il existerait d'autres canaux, perméables au Ca^{2+} (la superfamille des TRP : TRPC1, TRPC7 ou TRPC3), ayant la capacité d'être activés en réponse à différents stimulus (pour revue, (King and Freedman 2009)).

Enfin, comme pour tout mécanisme cellulaire, des modulateurs sont connus pour moduler cet influx calcique. En effet, un rôle activateur a été décrit pour le CD20 (Bubien, Zhou et al. 1993) alors que le CD22 et le FcγRIIb (**Figure 34**) sont connus pour inhiber ce phénomène d'entrée capacitive de Ca^{2+} par la phosphorylation de la protéine SHIP (Sato, Miller et al. 1996; Nimmerjahn and Ravetch 2008).

3.5 Le calcium dans l'immunodéficience

La comparaison de lymphocytes T de patients atteints d'un syndrome d'immunodéficiences combinées sévères (SCID) qui ont un défaut de signalisation calcique et un défaut de translocation de NFAT nucléaire avec ceux de sujets sains, a montré que 75% des gènes modulés au cours de l'activation des lymphocytes T étaient dépendants du calcium (Feske, Giltane et al. 2001). Le calcium peut être considéré comme un second messager. La régulation de l'homéostasie calcique permet la régulation des fonctions cellulaires.

Comme nous l'avons vu précédemment, des mutations de ORAI-1 et de STIM-1 ont été décrites chez des patients SCID (Feske, Gwack et al. 2006; Picard, McCarl et al. 2009). Bien que la population lymphocytaire semble normale, les lymphocytes T ne présentent aucun signal calcique suite à l'engagement du TCR (Feske 2009).

La mutation la plus courante sur ORAI-1 est R91W : substitution d'une Arginine en position 91 par un Tryptophane. En 2006, Feske *et al.* Montre que le courant I_{CRAC} est aboli par cette simple substitution alors que l'adressage de ORAI-1 et son association avec STIM-1 ne sont pas modifiés (Feske, Gwack et al. 2006). De plus, les populations de lymphocytes circulants sont normales, donc les différentes étapes de sélection et de maturation de ces cellules T semblent être totalement indépendante du mécanisme SOCE *via* ORAI-1. Enfin, cette mutation affecte également les lymphocytes B. Donc, l'immunodéficience en résultant doit être une combinaison des altérations d'activation des lymphocytes T et des B.

Plus récemment, une mutation de la protéine STIM-1 fut décrite chez des patients d'une même famille (Picard, McCarl et al. 2009). L'insertion d'une Adénine dans l'exon 3 (E128RfsX9), codant pour le domaine SAM, a pour conséquence de produire une molécule tronquée sans domaine EF-hand. Cette molécule ne peut donc plus remplir son rôle de senseur calcique. Cette protéine tronquée semble être très peu exprimée au niveau ARN messager. Cependant, le développement des populations lymphocytaires circulantes ne sont pas affectées. Mais l'absence de STIM-1 semble être à l'origine de maladies auto-immunes ou de syndromes lympho-prolifératifs. En effet, ces trois patients présentent tous un hépatosplénomégalie. De plus, deux d'entre eux souffrent d'une anémie hémolytique d'origine auto-immune, ce qui est en corrélation avec une diminution du nombre de lymphocyte T régulateurs ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) circulants. Toutes ces observations restent en accord avec les résultats *in vitro* (Oh-Hora, Yamashita et al. 2008) stipulant que le nombre de lymphocytes régulateurs est diminué dans des souris n'exprimant pas les protéines STIM-1 et STIM-2. Ces souris présentent, comme les patients SCID, des manifestations de maladies auto-immunes.

3.6 Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) sont des cellules clés de l'activation du système immunitaire pour induire une réponse allogénique spécifique de l'antigène.

3.6.1 L'activation et la maturation des cellules dendritiques

Plusieurs études montrent le rôle important du Ca^{2+} dans l'activation et les fonctions des DC murines, mais les connaissances concernant les DC humaines restent encore limitées. En effet, le traitement par un ionophore calcique, le CI A23187, entraîne une différenciation de monocytes humains en DC, ceci par caractérisation phénotypique. Ces DC produites par le CI A23187 ont le même phénotype et des fonctions semblables que les DC différenciées de façon conventionnelle, après traitement de monocytes humains à l'IL-4 et au GM-CSF. Cependant, les DC, différenciées par le CI A23187, ont un niveau d'expression du CD83 assez important, ce qui tendrait à penser que ces DC sont activées sans signal de maturation. Ceci est conforté par le fait qu'elle soit capable d'activer la prolifération de lymphocytes T allogéniques mais également d'induire une sécrétion d'IFN- γ par ces mêmes cellules T (Czerniecki, Carter et al. 1997).

Par ailleurs, la caractérisation du courant I_{CRAC} dans les DC murines ne date que de 2001 (Hsu, O'Connell et al. 2001). Cette étude montre la sensibilité des DC murines au Ca^{2+} extracellulaire. En effet, l'ATP, un éventuel agent de maturation et de chimiotactisme, induit une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire. Cette augmentation est sensible au potentiel mais est consécutive à une déplétion des stocks calciques intracellulaires (RE). De plus, cette entrée de Ca^{2+} est sensible au SKF-96365 ; ce qui suggère l'implication des mécanismes SOCE, et donc du courant I_{CRAC} , dans la maturation des DC murines. Depuis de nombreuses études ont montré l'importance des canaux ioniques dans les fonctions des DC murines. Une de ces études fait référence. En effet, Matzner *et al.* (2008) confirme la présence du courant I_{CRAC} mais propose des candidats pour les régulateurs de ce mécanisme SOCE (Matzner, Zemtsova et al. 2008). En effet, l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques (margatoxine et ICAGEN-4) a permis d'identifier le rôle de canaux potassiques dépendants du potentiel. En effet, ces canaux font sortir du potassium et vont donc hyperpolariser la membrane ce qui entraînera une favorisation de l'influx capacitif par un maintien du gradient électrochimique pour le Ca^{2+} (Cahalan, Wulff et al. 2001). De plus, par l'utilisation de ces inhibiteurs, Matzner *et al.* (2008) montrent qu'une inhibition ou modulation du signal calcique entraînerait une diminution des

marqueurs de surface (CMH de classe II), la migration dirigée par CCL-21 ou la production de cytokines tels le TNF- α ou l'IL-6 ; en réponse à une stimulation au LPS (Matzner, Zemtsova et al. 2008).

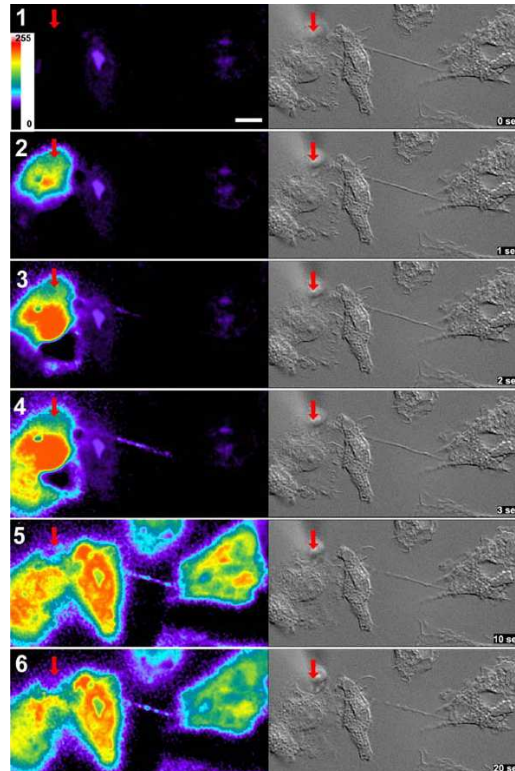


Figure 35 : Communication de l'influx calcique par les nanotubules (Watkins and Salter 2005)

En conclusion, de nombreux canaux modulant cet influx calcique sont présents au niveau de la membrane plasmique des DC. Lors d'un stimulus « plus physiologique », la présence d'une bactérie dans un organisme, un fort signal calcique est observé. Le contact de cette bactérie avec le phagocyte (les DC, par exemple) induit une forte augmentation de Ca^{2+} dans la CPA. Or, une étude récente montre la présence de communication entre cellules adjacentes. Dans l'exemple de la peau, les DC forment un réseau complexe. Watkins *et al.* (2005) montrent que les DC sont capables de se transmettre l'influx calcique, issu de la stimulation bactérienne (Watkins and Salter 2005).

Ce transfert se fait par l'intermédiaire de nanotubules connectant les cellules les unes aux autres. Cette capacité de transduire le signal d'une cellule à l'autre était également présente chez les DC immatures, ce qui permettrait, au vue de sa rapidité, d'« alerter » un grand nombre de DC, comme le réseau de cellules de Langherans de la peau.

3.6.2 *Le chimiotactisme des cellules dendritiques*

Les mécanismes de migration des cellules myéloïdes restent encore peu connus. La migration des monocytes semble être contrôlée par le Ca^{2+} . En effet, une étude sur le rôle du CD38 (une ectoenzyme) apporte quelques éclaircissements sur le rôle du Ca^{2+} dans les processus de migration (Partida-Sanchez, Goodrich et al. 2004). Cependant, l'influx calcique, produit par l'activation de cette protéine, n'est pas en réponse à une vidange des stocks réticulaires : le médiateur de cette entrée est le TRPC2, activé directement par le CD38 (Hara, Wakamori et al. 2002). Cet influx calcique aurait un rôle dans le processus d'apoptose. De plus, des souris déficientes en CD38 vont avoir des DC incapables de migrer (*in vitro* et *in vivo*) bien que leur maturation apparaisse normale. Il semblerait donc que le Ca^{2+} ait un rôle majeur dans la capacité des cellules myéloïdes à migrer, fonction nécessaire pour une surveillance accrue de l'organisme.

IV. OBJECTIFS DE L'ETUDE

Les cellules dendritiques (DC) sont des cellules pivot de l'induction de la réponse immune. Elles sont capables d'induire une réponse immune effectrice ou une réponse immune tolérante. Dans l'organisme, ces cellules existent sous une forme immature. Sous l'influence de signaux spécifiques, les cellules dendritiques vont passer au stade mature avec des nouvelles propriétés. Une fois matures, les cellules dendritiques vont orienter la réponse immunitaire au travers de la polarisation des lymphocytes T. L'observation que des greffés rénaux traités par des inhibiteurs calciques avaient une meilleure survie de greffe, nous fait penser que le calcium est un élément clef de leur physiologie. En effet, aucune cellule ne saurait exister sans une régulation des flux calciques. Mais, peu de données existent sur la régulation des flux calciques, ni des canaux impliqués au cours de la maturation des cellules dendritiques humaines. Notre objectif est d'étudier la physiologie calcique des cellules dendritiques humaines au cours de la maturation, ainsi que dans leurs fonctions. L'impact des immunosuppresseurs sur la régulation calcique dans les cellules dendritiques sera étudié. Ces données devraient nous apporter des éléments pour optimiser les traitements actuels de la greffe et d'envisager d'autres approches comme l'utilisation des inhibiteurs calciques spécifiques pour induire une tolérance immune.

Dans ce projet, nous étudierons le rôle de la physiologie calcique sur les grandes fonctions des cellules dendritiques humaines (hDC). D'abord au cours de la maturation, étape essentielle de la vie de la DC, nous identifierons les différents canaux ioniques membranaires impliqués selon les différents agents de maturation. Pour cela, il est nécessaire d'analyser les différents types de courants existants au cours de cette maturation par des approches d'électrophysiologie (des techniques de « patch-clamp » en configuration « cellule entière »). Enfin, nous analyserons le rôle du calcium dans les fonctions de la DC humaine.

Matériels & Méthodes

I. REACTIFS

Le RPMI-1640, la L-Glutamine, le cocktail d'antibiotiques Pénicilline/Streptomycine, le PBS (Phosphate-Buffered Saline), l'EDTA (ethylene diamine tetra-acetic acid) et le sérum de veau foetal (SVF) proviennent de chez Gibco (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Le sérum de veau foetal est décomplémenté pendant 30 minutes à 56°C avant d'être ajouté au milieu de culture. L'IL-4 recombinante humaine (rh) et le TNF- α ont été achetés chez R&D Systems (Lille, France) et le rhGM-CSF de chez Peprotech (Paris, France). Le zymosan a été acheté chez Invivogen (Toulouse, France) alors que le LPS (*Escherichia coli*), le MPA, le 2-APB (2-amino-phényl-borate), la Thapsigargin, l'IbTx (inhibiteur du canal BKCa), le TRAM-34 (inhibiteur du canal KCA3.1 ou SK4), proviennent de chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). L'EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid) provient de chez Boehringer Mannheim (Ingelheim, Germany).

II. OBTENTION DES CELLULES DENDRITIQUES HUMAINES

1. Différenciation des monocytes en cellules dendritiques

Le sang issu de donneurs sains ayant signé un consentement éclairé est obtenu par cytophérèse. Le sang est alors centrifugé pendant 15 min à 1000g. Les cellules mononucléées humaines du sang périphérique (CMSP ou PBMC) sont alors condensées en anneau et donc isolées par centrifugation (990g) sur un gradient de sédimentation (Ficoll Hypaque, $d = 1,077$; Lymphoprep, Nycomed, Oslo, Norvège). Les PBMC sont lavées deux fois dans le milieu RPMI complémenté en Pénicilline/Streptomycine à 1% (appelé par la suite RPMI seul) à 600g puis deux autres fois à 400g afin d'éliminer les plaquettes. Les cellules sont re-suspendues dans le milieu RPMI seul complémenté avec 5% de SVF puis $2 \cdot 10^8$ cellules sont mises à adhérer en flasques (175 cm²-Falcon flask, Becton Dickinson, Mountain View, Etats-Unis) pendant 45 minutes à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO₂. Les flasques sont ensuite lavées deux fois avec du RPMI seul afin d'éliminer les cellules non adhérentes. La qualité de l'adhésion est évaluée visuellement par microscopie optique inversée. Les cellules

adhérentes sont mises en culture à 37°C sous atmosphère humide contenant 5% de CO₂ dans du milieu RPMI seul contenant 10% de SVF et 1% de L-Glutamine (RPMI complet), supplémenté par 25ng/mL de rhIL-4 et 1000 UI/mL de rhGM-CSF. Après cinq jours de culture, les cellules sont récupérées et dénombrées en présence de bleu Trypan afin d'évaluer la mortalité cellulaire et en cytométrie de flux pour évaluer la contamination lymphocytaire.

2. Maturation des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques immatures (1.10^6) sont mises en culture dans une plaque de culture P24, à une concentration de 1.10^6 /mL, contenant du RPMI complet supplémenté par 25ng/mL de rhIL-4 et 1000 UI/mL de rhGM-CSF à 37°C sous atmosphère humide contenant 5% de CO₂. La maturation est induite pendant 18h soit par l'ajout de Thapsigargin (TG), de LPS (50ng/mL), de Zymosan (50µg/mL) ou de TNF- α (25 ng/mL) en présence ou non d'inhibiteur chimique spécifique.

Au bout de 18h de maturation, les cellules dendritiques sont centrifugées puis les surnageants sont prélevés. Les cellules sont ensuite lavées deux fois par le RPMI seul puis re-suspendues dans du milieu RPMI complet. La numération des cellules a lieu en présence de bleu Trypan afin d'évaluer la mortalité cellulaire.

III. CARACTERISATION DES CELLULES DENDRITIQUES

1. Etude de l'expression des marqueurs de surface par cytométrie en flux

La cytométrie en flux (CMF) est définie comme l'étude précise de particules isolées (cellules dans notre cas) marquées spécifiquement avec un agent fluorescent et entraînées par un flux de liquide. C'est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules en suspension dans un liquide. Elle consiste à analyser les signaux optiques ou physiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser. Ce

procédé d'analyse cellule par cellule est multiparamétrique et peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde. L'ordinateur calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres mesurés et représente les résultats sous la forme d'histogrammes (un paramètre) ou de cytogrammes (deux paramètres).

Les cellules dendritiques sont réparties dans une plaque 96 puits à fond rond à raison de $1,5 \cdot 10^5$ cellules par puits, puis lavées avec 200 μ L de tampon de marquage (PBS contenant 4% de SVF et 0,1% d'azide). Les cellules sont ensuite centrifugées 5 minutes à 600g puis incubées avec les différents anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes pendant 30 minutes à 4°C. Après le marquage, les cellules sont lavées avec 200 μ L de tampon de marquage, centrifugées 5 min à 600g et re-suspendues dans 200 μ L de tampon de marquage puis un minimum de 30 000 événements par échantillon a été analysé grâce au cytomètre BD Canto II (Becton Dickinson). Les résultats sont analysés par le logiciel FACS Diva (BD Biosciences).

Les anticorps suivants ont été utilisés pour caractériser le phénotype des cellules dendritiques : les anticorps anti-CD83 conjugué au FITC (clone HB15e, IgG1), l'anti-CD86 conjugué au PE-Cy5 (clone 2331, IgG1), l'anti-CD25 conjugué à l'APC (clone M-A251, IgG1), l'anti-HLA-DR conjugué à l'APC (clone G46-6) de chez BD Pharmingen ainsi que les anticorps anti-CD80 conjugué au PE (clone MAB104, IgG1) et l'anti-CD209 (ou DC-Sign) conjugué au PE (clone AZND1) de chez Beckman Coulter (Villepinte, France).

Pour la détection intracellulaire des cytokines, les cellules sont marquées avec un anti-CD209 couplé au fluorochrome PE (clone AZND1, IgG1; Beckman Coulter, Villepinte, France) pendant 30 minutes à 4°C puis perméabilisées avec la solution BD cytofix/cytoperm (Becton-Dickinson, Grenoble, France) pendant 20 minutes à 4°C et enfin marquées avec soit un anticorps anti-IFN- γ conjugué au fluorochrome APC (clone B27, IgG1), un anti-IL-10 conjugué au APC (clone JES3-19F1, IgG1), un anti-IL-12 conjugué au FITC (clone C11.5, IgG1) ou un anti-IL-4 conjugué au PE (8D4-8) de chez Becton Dickinson (Grenoble, France) selon les instructions du fournisseur.

Les données sont représentées par le pourcentage de positivité de cellules marquées.

2. Etude de la sécrétion de cytokines par la technique ELISA

Les surnageants de culture sont récupérés puis stockés à -20°C jusqu'à la réalisation de l'ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Plusieurs concentrations de cytokines ont été déterminées dont l'IL-12p70, l'IFN- γ et l'IL-10 selon les instructions des kits ELISA Ready-Set-Go correspondants (eBioscience). Les mesures sont effectuées en duplicata pour chaque échantillon. La quantification est réalisée à l'aide d'une courbe-étalon obtenue grâce à des cytokines recombinantes purifiées. Les densités optiques sont mesurées à l'aide d'un lecteur de plaque ELISA à une longueur d'onde de 450nm.

IV. SPECTROFLUORIMETRIE

1. Mesure de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} par spectrofluorimétrie avec une sonde fluorescente : le FURA-2

Le Fura-2 est une sonde fluorescente sensible au Ca^{2+} de seconde génération dérivée d'un chélateur du Ca^{2+} , l'EGTA. La liaison du Ca^{2+} avec la sonde entraîne à la fois une variation de l'intensité de fluorescence et un déplacement du spectre d'excitation du Fura-2. Le Fura-2 est une sonde à double excitation/mono émission. En effet, l'intensité de fluorescence émise par le Fura-2 à 515 nm, obtenue en réponse à une excitation à 340 nm (F340) et 380 nm (F380) en présence et en absence de Ca^{2+} , se traduit par une augmentation de F340 et une diminution F380. La mesure du rapport de fluorescence F340/F380 permet d'estimer la concentration en Ca^{2+} intracellulaire. Les mesures en Fura-2 nécessitent un appareillage de changement continu de filtres excitateurs ou de monochromateurs pour effectuer les deux excitations à 340 et 380 nm. Le Fura-2, comme la plupart des indicateurs fluorescents du Ca^{2+} , est un anion polyarboxylé imperméant. Il ne peut être introduit dans les cellules que par perméabilisation ou micro-injection. Ainsi, le Fura-2 a été rendu perméant en ajoutant un groupement acétoxyméthylester (AM) destiné à masquer les charges négatives sur les groupements carboxyles de la molécule. Sous cette forme non chargée, l'ester AM devient hydrophobe et peut passer à travers les membranes. Cependant sous cette forme la sonde est totalement insensible au Ca^{2+} . Il faut donc retirer le groupement AM qui est clivé par des estérases intracellulaires et la sonde active s'accumule dans la cellule (**Figure 36**).

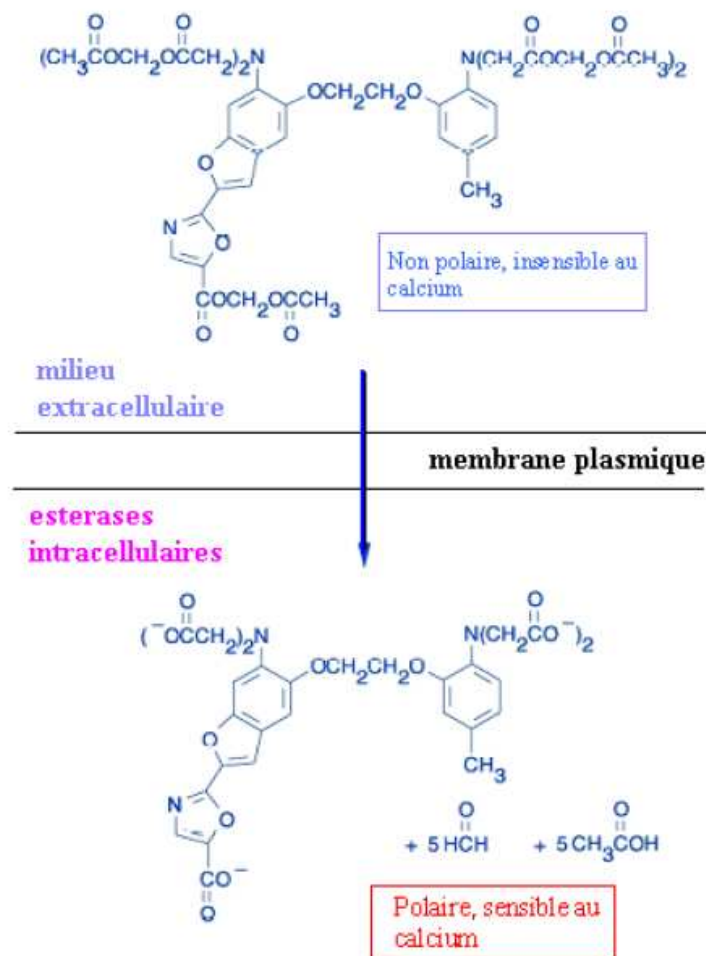


Figure 36 : Structure chimique du Fura-2AM extracellulaire et du Fura-2 après clivage du groupement AM par des estérases intracellulaires. Le Fura-2AM (Acetoxymethylester) est insensible au Ca²⁺. Le groupement AM rend la sonde fluorescente perméante en masquant les charges négatives des groupements carboxyles. Le Fura-2, lui est chargé donc n'est plus perméant et est sensible au Ca²⁺ intracellulaire.

2. Chargement des cellules par le FURA-2AM

Les DC sont mises à adhérer dans des boîtes de Pétri à fond en verre, grâce à la polyL-Lysine (Sigma-Aldrich, France). Elles sont sorties de l'incubateur et le milieu de culture est remplacé par 1 mL d'une solution PSS/Fura-2 à une concentration finale de 5 µM. Les cellules sont laissées 75 min dans le noir et à 37°C en présence de la solution de Fura-2. La solution stock de Fura-2 (Molecular Probes, USA) est distribuée sous forme d'aliqots, sous azote, à une concentration de 1 mM (le Fura-2 est dilué dans du DMSO) et est conservée à -20°C. Après incubation les cellules sont mises en présence d'une solution PSS sans Fura-2

pendant 15 à 20 min, à température ambiante ce qui laisse le temps aux cellules d'hydrolyser le groupement AM de la sonde. La boîte est ensuite placée sur la platine inversée d'un microscope à fluorescence (Nikon Eclipse TE2000-S, Nikon, France). La source d'excitation lumineuse provient d'une lampe Xénon 75-W et un monochromateur (Cairn Optoscan, UK) permet d'exciter alternativement la sonde aux deux longueurs d'ondes d'intérêt. La sonde est excitée pendant 50 ms toutes les deux secondes. Le signal de fluorescence émis à 510 nm est récupéré et amplifié par un photomultiplicateur (PMT). Le signal est alors numérisé par un convertisseur analogique/numérique (Digidata 1322A, Axon Instrument, USA) et analysé avec Clampex 8.2 (Axon instrument, USA). Les données sont analysées avec Clampfit 8.2 (Axon Instrument, USA) et Origin 7.0 (Microcal Software).

La calibration de la sonde Fura-2 a été réalisée en utilisant un ionophore calcique la Ionomycine (Sigma-Aldrich, France ; I3909). Nous avons préparé deux solutions extracellulaires : une dépourvue Ca^{2+} (0Ca^{2+} , 5 mM d'EGTA, 10 μM de Ionomycine) et une solution saturée en Ca^{2+} (2Ca , 10 μM de Ionomycine). Les cellules ont été mises en présence de la solution dépourvue et saturée en Ca^{2+} et nous avons pu ainsi calculer respectivement le rapport minimum (R_{min}) et maximum (R_{max}) entre les formes F340 et F380. La concentration de Ca^{2+} intracellulaire est déterminée par la relation (la calibration étant recalculée pour chaque boîte) (Grynkiewicz *et al.*, 1985) :

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \cdot \beta \cdot (\text{R} - \text{R}_{\text{min}}) / (\text{R}_{\text{max}} - \text{R}) \text{ où } \beta = \text{F380}_{(2\text{Ca})} / \text{F380}_{(0\text{Ca})}$$

3. Solutions expérimentales

Lors de l'étude électrophysiologique des cellules, le milieu de culture contenant des protéines et facteurs de croissance peut perturber la charge des cellules par le FURA-2. Il est par conséquent rincé et substitué par une solution saline physiologique de préservation appelée PSS (Physiological Saline Solution) dont la composition est reportée dans le tableau ci-dessous. Le PSS nous permet de contrôler totalement les concentrations en ions et donc leurs potentiels d'équilibre. Les bloqueurs pharmacologiques utilisés ou autres molécules utilisées sont diluées à la concentration désirée dans le PSS et perfusés dans le milieu extracellulaire au contact proche de la cellule.

Composition de différentes solutions extracellulaires

| | PSS | PSS 0-Ca ²⁺ |
|-------------------|-----|------------------------|
| NaCl | 140 | 140 |
| NMDG | - | - |
| CaCl ₂ | 2 | - |
| MgCl ₂ | - | 2 |
| KCl | 4 | 4 |
| HEPES | 10 | 10 |
| D-(+)-Glucose | 11 | 11 |
| EGTA | - | 1 |

Tableau 5 : Composition des différentes solutions extracellulaires utilisées (en mM). Le pH est ajusté à 7,4 avec NaOH pour PSS et PSS 0-Ca²⁺.

V. ETUDE DE LA TRANSCRIPTION DU GENE EN ARNm PAR LA TECHNIQUE DE REVERSE TRANSCRIPTION - POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR)

1. Extraction et dosage des ARN cellulaires totaux

La purification d'ARN intégrés à partir d'un échantillon de tissu ou de cellules en culture est la première étape pour de nombreuses applications en biologie moléculaire telles que les analyses de Northern blot, la sélection d'ARN poly(A), la construction de banques d'ADN complémentaires (ADNc),...

En ce qui nous concerne, nous avons cherché à déterminer quels sont les gènes exprimés en ARN messagers (ARNm) sur les différentes conditions de culture des cellules, pour les transcrire de façon inverse en ADNc, puis en faire une amplification par PCR. Le moyen

utilisé pour récupérer les ARNm fut d'extraire les ARN totaux utilisation du kit Promega RNAagents® Total RNA Isolation System (Promega Corporation, Madison, WI, USA).

Les cellules sont rincées deux fois successivement avec du PBS, puis récoltées et centrifugées (700 x g pendant 5mn). Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est récupéré dans du PBS.

La solution de dénaturation refroidie dans la glace (contenant 26 mM de citrate de sodium, 0,5% de N-lauryl sarcosine, 0,125 M de β -mercaptoethanol et 4 M de Thiocyanate de guanidine) est ajoutée au culot cellulaire et permet la rupture cellulaire en même temps que le blocage des RNAses (les enzymes de dégradation de l'ARN).

De l'acétate de sodium (2M, pH4) est ajouté au lysat cellulaire et l'extraction des ARN totaux se fait par séparation des différents constituants cellulaires dans le mélange Phénol / Chloroforme / Alcool Isoamylique. Après vingt minutes de centrifugation à 10 000 x g à la température de 4°C, les ARN sont récupérés dans la phase aqueuse supérieure. Il s'agit alors de les précipiter dans l'isopropanol (24 heures à -20°C ou 2 heures à -80°C) et d'éliminer le surnageant. Il est possible de réaliser un lavage à l'éthanol 75% pour éliminer les traces de guanidine restante de la solution de dénaturation avant de solubiliser les ARN totaux dans de l'eau ultra-pure sans nucléase.

Le dosage des ARN peut se faire alors par photométrie par comparaison de l'absorbance pour trois longueurs d'onde : 260, 280 et 230 nm. L'absorbance à 260 nm traduit la quantité d'ARN ou d'ADN. Il s'agit en fait de l'absorbance des bases des acides nucléiques. L'absorbance à 280 nm traduit la quantité de protéines présentes (en effet certains acides aminés aromatiques absorbent à cette longueur d'onde. L'idéal étant que le rapport des absorbances 260/280 nm soit proche de 2. Un faible rapport indiquera une contamination par les protéines, il est alors conseillé de refaire une extraction dans le phénol / chloroforme (avec le risque de perdre des ARN). Quant au rapport d'absorbance à 260/230 nm, il traduit, quand il est faible, la contamination par la guanidine pouvant provenir de la solution de dénaturation initiale. Il faut alors refaire une précipitation en présence d'acétate de sodium (2M) et d'un volume équivalent d'isopropanol. Une unité d'absorbance à 260 nm correspond à 40 μ g/mL d'ARN simple brin total.

2. Transcription inverse (Reverse Transcription : RT)

La transcription inverse consiste, grâce à l'activité d'une enzyme appelée « reverse transcriptase », à obtenir à partir d'un ARN, la séquence complémentaire d'ADN. Cet ADN comporte alors uniquement la séquence exonique du gène, débarrassée de ses introns après l'épissage, et est défini de complémentaire (ADNc).

Les ARNm présentent tous, à l'exception des ARNm des histones, une queue faite de 200 à 250 nucléotides à Adénosine en 3', aussi appelée poly(A). Cette particularité a été originellement mise à profit pour effectuer la transcription reverse uniquement des ARNm par l'utilisation d'une amorce de type Oligo(dT) (**Figure 37**). Cet oligonucléotide à thymine s'apparie au poly(A) pour former une amorce indispensable à la reverse transcriptase qui, en présence des désoxynucléotides triphosphates dATP, dCTP, dGTP et dTTP, va synthétiser le brin complémentaire d'ADN. Nous sommes alors en présence d'un hétéroduplex ARNm/ADNc. Pour ne récupérer que l'ADNc simple brin, il est indispensable de faire agir une RNase H qui va dégrader les fragments d'ARN contenus dans les hétéroduplex ARN/ADN.

Dans le cadre de nos études, nous avons utilisé une méthode plus récente qui consiste à réaliser la transcription reverse des ARN totaux en utilisant comme amorces des désoxynucléotides hexamériques synthétisés au hasard (random primers pd(N)₆ 5'-Phosphate, ref 27-2166-01, Amersham Biosciences, UK). Ces oligonucléotides vont alors reconnaître différentes séquences et se fixer aléatoirement mais de façon complémentaire à tous les ARN présents dans le milieu réactionnel (**Figure 37**). La reverse transcriptase permet alors la synthèse d'ADNc, à partir de tous les ARN (messagers, de transfert, ribosomaux), qui seront récupérés sous la forme de fragments simples brins après action de la RNase H.

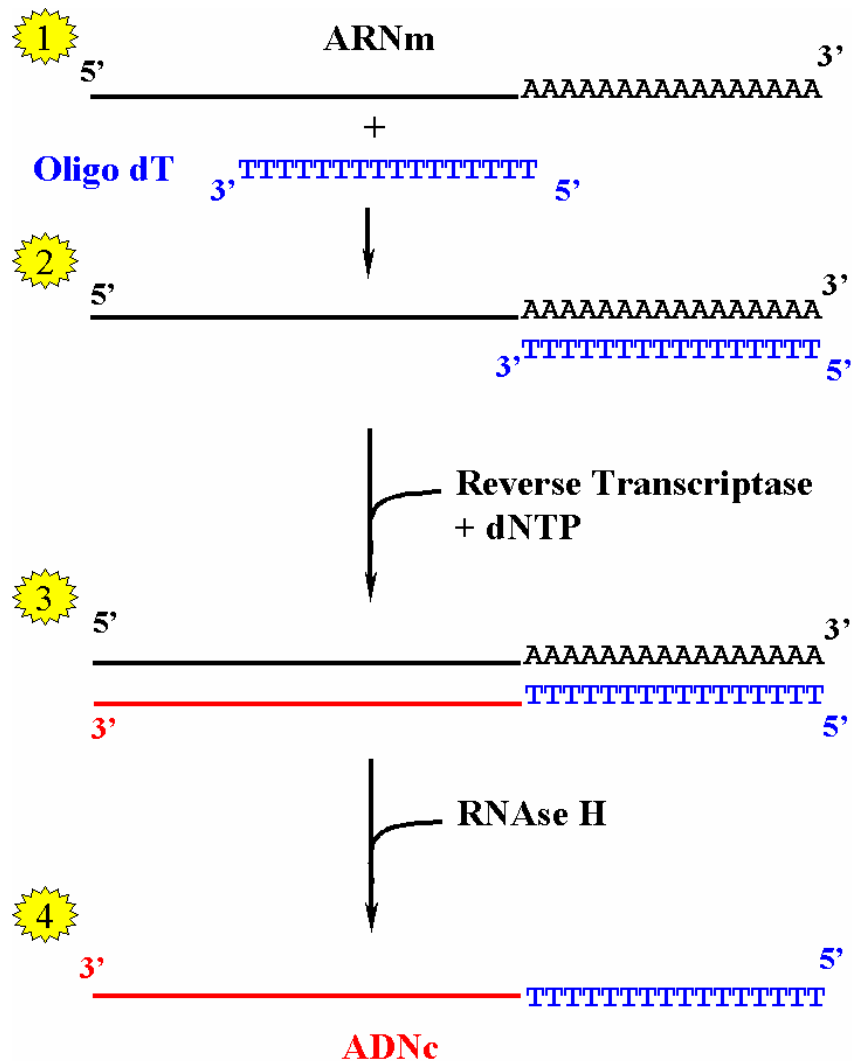


Figure 37 : Schéma général de la transcription inverse d'ARNm en ADNc utilisant comme amorce un oligo dT. 1, addition de l'oligo dT dans le milieu réactionnel. 2, appariement de l'oligo dT avec la queue poly(A) de l'ARNm. 3, transcription inverse de l'ARNm en ADNc, en présence de la reverse transcriptase et des différents désoxynucléotides triphosphates. 4, digestion des ARN des hétéroduplex ARN/ADN par la RNase H.

Nous avons utilisé le kit de transcription inverse « Ready-to-go You-prime First-Strand Beads (Ref : 27-9264-01, Amersham Biosciences, UK) qui se présente sous la forme de billes lyophilisées qui contiennent tous les réactifs et enzymes nécessaires : le tampon, les désoxynucléotides triphosphates (dATP, dTTP, dGTP et dCTP), une reverse transcriptase murine (FPLCpure™), du RNAGuard™ pour éviter la dégradation d'ARN.

Nous avons utilisé 2 µg d'ARN total, pour chaque transcription inverse, que nous avons placés dans un volume réactionnel de 32 µl total (qsp avec de l'eau RNase et DNase-free). L'échantillon est alors dénaturé pendant 10 minutes à 65°C puis refroidit sur glace pendant 2

minutes avant de le mettre en contact avec la bille réactionnelle. On ajoute alors 0,2 µg de primers pd(N)₆ dans le milieu réactionnel. La réaction de reverse transcription se fait alors en 1 heure à une température de 37°C.

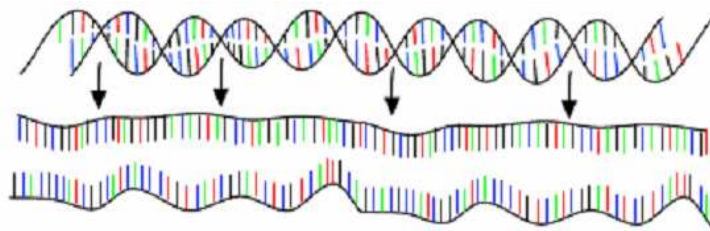
3. Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction : PCR)

La réaction de polymérisation en chaîne ou PCR (Polymerase chain reaction) est une technique de biologie moléculaire très utilisée, mise au point dans les années 1980 par Kary B. Mullis (Prix Nobel de Chimie en 1993) et qui permet une forte amplification sélective d'une séquence spécifique d'ADN. Ainsi, il est possible d'obtenir un très grand nombre de copies du gène d'intérêt à partir de très peu de molécules. Cette technique comporte de très nombreuses applications telles que la constitution de bibliothèques d'ADNc, la recherche de maladies génétiques, l'amplification de séquences d'ADN pour le clonage, l'identification génétique d'individus à partir de différents échantillons (sang, cheveux, sperme,...), ou encore l'identification de l'expression de différents gènes d'intérêt.

La séquence nucléotidique de la région d'ADN à amplifier n'est pas nécessairement connue dans sa totalité. Seules deux courtes séquences aux extrémités de la zone à amplifier doivent être déterminées afin de servir d'amorces à la réaction de polymérisation (voir chapitre suivant : « Détermination des amorces de PCR »).

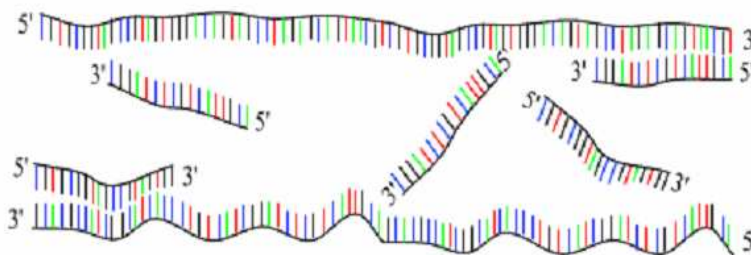
La réaction de PCR est constituée de n cycles (30 à 40) de trois étapes (**Figure 38**). La première étape est une étape de **dénaturation de l'ADN** bicaténaire en deux brins d'ADN monocaténaire à une température proche de 95°C. La seconde étape consiste en **l'hybridation spécifique des amorces** sur les brins d'ADN monocaténaires, à une température inférieure à celle de dénaturation (classiquement située autour de 60°C, mais variant en fonction de la séquence à amplifier). Les amorces se fixent à l'extrémité 3' des monobrans d'ADN puisque la troisième étape, **l'élongation**, qui est la synthèse du brin complémentaire d'ADN à partir de l'amorce se fait dans le sens 5' vers 3'. Cette synthèse d'ADN complémentaire se déroule à une température supérieure à celle de la renaturation de l'ADN matrice : classiquement 72°C. A cette température la majorité des enzymes est dénaturée, c'est pourquoi nous utilisons une ADN polymérase dont l'activité est résistante à de très hautes températures : la *Taq polymérase* qui est extraite de *Thermophilus aquaticus*, un microorganisme vivant à proximité

des sources hydrothermales. Cette étape nécessite bien entendu l'apport des différents désoxy-nucléotides sous leur forme triphosphate (dNTP : dATP, dTTP, dGTP et dCTP).



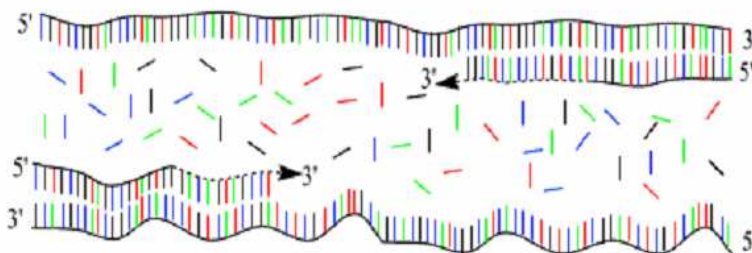
Etape 1:

Dénaturation de l'ADN
95°C



Etape 2:

Hybridation des amorces
~ 60°C



Etape 3:

Elongation dans le sens
5' → 3'
~ 72°C

Figure 38 : Les trois étapes successives d'un cycle de la réaction de PCR (dénaturation, hybridation et élongation).

Nous pouvons ainsi comprendre qu'à chaque cycle, le nombre de copies du fragment d'ADN d'intérêt est doublé. Le nombre théorique de molécules d'ADN après n cycle est par conséquent de 2^n . Ce nombre est théorique et présuppose que l'efficacité de l'élongation à chaque cycle est de 100%, ce qui est loin d'être le cas en pratique (hybridation plus ou moins bonne des amorces et élongations plus ou moins complètes). Une meilleure approximation du nombre final de copies (N_f) est donnée par l'équation suivante :

$$N_f = N_0 (1 + Y)^n$$

Avec N_0 , le nombre de copies initiales ; Y, l'efficacité de l'élongation compris entre 0 et 1, et n, le nombre de cycles.

Dans nos études, nous avons utilisé des kits de PCR : puREtaq Ready-To-Go PCR Beads (Ref : 27-9557-01, Amersham Biosciences, UK). Ce kit est constitué de billes lyophilisées stables à température ambiante comprenant : de la BSA, les quatre dNTP nécessaires à la synthèse du brin d'ADN, environ 2,5 unités de puReTaq DNA polymérase™ et du tampon réactionnel. Lorsque la bille est reconstituée dans 25 µL de solution finale, la concentration de chaque dNTP est de 200 µM dans une solution tampon à 10 mM Tris-HCl (pH 9 à température ambiante), 50 mM KCl et 1,5 mM MgCl₂. Pour chaque réaction, il faut donc ajouter les deux amorces (« Forward » ou « sens » et « Reverse » ou « antisens ») que nous avons utilisé à une concentration finale de 0,5 µM (12,5 pmol dans les 25µL réactionnels finaux comme le stipulent les recommandations du fabricant : entre 5 et 25 pmol), ainsi que la matrice d'ADNc (environ 80 ng) avant de compléter au volume final de 25 µL. Nous avons réalisé, dans nos études, des PCR de 40 cycles à l'aide d'un thermocycleur (Biometra Uno-Thermoblock 9609145, Allemagne). Chaque cycle comprenait les 3 étapes suivantes : la dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, l'hybridation des amorces à 60°C pendant 1 minute, et la phase d'élongation à 68°C pendant 2 minutes. Une fois la PCR réalisée, les fragments d'amplifications étaient conservés à une température de 4°C. Afin d'éviter les phénomènes d'évaporation des échantillons au cours des différents cycles de la PCR, le couvercle du thermocycleur est réglé à une température de 99°C et les échantillons sont recouverts d'une goutte d'huile minérale (SIGMA, M-5904, Saint-Quentin Fallavier, France).

4. Conception des amorces

Comme nous avons pu le voir, la réaction de PCR nécessite l'hybridation d'un couple d'amorces oligonucléotidiques spécifiques sur la séquence d'ADN que l'on souhaite amplifier. La qualité de l'hybridation dépend de la quantité et de la qualité des amorces utilisées, ainsi si le rapport matrice d'ADN / amorces est important, la séquence de ces dernières est déterminante. Il faut par conséquent connaître les extrémités de la séquence cible à amplifier et pour cela il est souvent possible de télécharger, à partir d'une banque de données (ex : Genbank), la séquence complète d'ADN du gène d'intérêt (sur le site du NCBI : National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Il faut ensuite déterminer la portion intéressante à amplifier et choisir les séquences qui serviront à l'amorçage. Nous avons alors utilisé le site PRIMER 3 (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi->

[bin/primer/primer3_www.cgi](#)) qui nous permet de sélectionner les meilleures amorces possibles avec différents critères : taille du fragment à amplifier, taille des amorces (souvent 20 nucléotides), % de GC (au moins 50%), température de fusion (T_m , proche de 60°C), ... Il nous reste encore à vérifier sur le site BLAST (<http://www.ncbi.nih.gov:80/BLAST/>) que les amorces choisies ne risquent pas d'amplifier une séquence d'un autre gène différent de celui voulu. Il est aussi possible de déterminer, avec l'aide du site ENSEMBL (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/exonview?transcript=ENST00000219070&), l'enchaînement des différents exons d'un gène avant de déterminer le couple d'amorces à utiliser. En effet il est intéressant de déterminer une séquence à amplifier qui soit à cheval sur deux ou plus d'exons : il sera ainsi possible de vérifier si l'ADNc a pu être contaminé par de l'ADN génomique. Dans ce cas nous observerions l'amplification de fragments plus grands qui comporteraient en plus de leurs séquences exoniques, des séquences introniques intercalantes. Pour exemple, nous pouvons (**Tableau 6**) les amorces que nous avons choisies pour identifier l'expression d'ARNm codant les canaux ioniques (calciques ou potassiques). On distingue alors l'amorce « Forward » (ou « sens ») de l'amorce Reverse (ou « antisens »). L'amorce Forward est directement sélectionnée sur le brin 5'→3' d'ADN et ira par conséquent se fixer par complémentarité de bases sur le brin 3'→5' complémentaire d'ADN. Quant à l'amorce Reverse, elle est sélectionnée sur le brin 3'→5' pour être directement complémentaire du brin 5'→3' d'ADN. Dans le tableau 11 sont représentés les différents gènes dont l'expression nous intéressait et pour lesquels nous avons sélectionné des couples d'amorces spécifiques.

| | Sens | Antisens |
|--------|----------------------|----------------------|
| STIM-1 | GCATCTTGCCTGGAGACCGT | CAAGACGGACGCATACATCC |
| ORAI-1 | GTCACCTACCCGGACTGGAT | TGGAGGCTTTAAGCTTGGCG |
| KCa3.1 | CATTCCTGACCATCGGCTAT | ACGTGCTTCTCTGCCTTGTT |
| KCa1.1 | GCTCCGTGCCAGCAACTTTC | CAGCCCTTAAATCAGCCCGA |

Tableau 6 : Amorces de PCR

VI. MARQUAGE POUR L'ANALYSE EN MICROSCOPIE CONFOCALE

La veille de l'analyse en microscopie confocal, de la poly-L-lysine diluée au $1/20^{\text{ème}}$ est déposée pendant 45 min sur les lames Labtek® (Nalga Nunc International, ref 154534) afin de permettre l'adhérence ultérieure des cellules. La poly-L-lysine est retirée et $1,5 \cdot 10^5$ cellules sont déposées dans chaque puits que l'on laisse reposer 30 min à température ambiante. Le surnageant est ensuite jeté par retournement.

Pour le marquage intracellulaire (KCa3.1 et STIM-1), 200 μL de Cytofix/Cytoperm (kit Becton Dickinson) sont ajoutés. Après une incubation de 20 min à 4°C à l'obscurité, les Labtek® sont rincées 2 fois avec 200 μL de PermWash du Kit BD (Becton Dickinson, ref 554715). Les anticorps, primaires, monoclonal de chèvre dirigé contre KCa3.1 (Santa Cruz Biotech, USA, sc-27081) et monoclonal de souris dirigé contre STIM-1 (Santa Cruz Biotech, USA, sc-79106), dilués au $1/150^{\text{ème}}$ dans du tampon de marquage (PBS 4% SVF 0,1% Azide) sont déposés dans chacun des puits avec pour volume final de 250 μL . Les Labtek® sont incubées 30 min à température ambiante. Chacun des puits sont ensuite rincées avec 200 μL de tampon de marquage. Les anticorps secondaires anti-chèvre couplé au fluorochrome AlexaFluor® 647 (Invitrogen Molecular Probes, A21244) et anti-souris couplé au fluorochrome AlexaFluor® 488 (Invitrogen Molecular Probes, A11001), dilués au $1/200^{\text{ème}}$ dans du tampon de marquage sont déposés dans un volume final de 250 μL par puits. Après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, les puits sont rincés avec 200 μL de tampon de marquage.

Pour le marquage extracellulaire, l'anticorps, primaire, monoclonal de lapin dirigé contre ORAI-1 (Santa Cruz Biotech, USA, sc-68895) et monoclonal de chèvre contre KCa1.1 (Santa Cruz Biotech, USA, sc-14746) dilués au $1/150^{\text{ème}}$ dans du tampon de marquage (PBS 4% SVF 0,1% Azide) sont déposés dans chacun des puits avec pour volume final de 250 μL . Les Labtek® sont incubées 30 min à température ambiante. Chacun des puits sont ensuite rincées avec 200 μL de tampon de marquage. L'anticorps secondaire anti-lapin couplé au fluorochrome AlexaFluor® 555 (Invitrogen Molecular Probes, A31572) ou anti-chèvre couplé au fluorochrome AlexaFluor® 647 (Invitrogen Molecular Probes, A21244) et dilués au $1/200^{\text{ème}}$ dans du tampon de marquage est déposé dans un volume final de 250 μL par puits. Après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, les puits sont rincés avec 200 μL de tampon de marquage. Les Labtek® sont, par la suite, séchés par évaporation. Les

chambres des Labtek® sont arrachées à l'aide de l'outil fourni par le fournisseur. Une goutte du milieu de montage (contenant du DAPI ; Invitrogen Molecular Probes, P36935) est déposée dans chaque puits. Enfin, une lamelle est placée sur les puits, puis luter à l'aide d'un vernis. L'analyse des préparations a été réalisée au laboratoire U637 « Physiopathologie cardiovasculaire » de l'université de Montpellier en collaboration avec le Dr. Jérémy Fauconnier. La lecture des lames préparées se fera à l'aide d'un microscope confocal LMS510 meta Zeiss, équipé avec un objectif à immersion (à eau) x63 (NA:1.2). Les images montrées sont issues d'une même lame, avec un double marquage. Un laser rouge sera utilisé pour exciter l'AlexaFluor®555 et 647 et un vert pour l'AlexaFluor® 488.

VII. ELECTROPHYSIOLOGIE CELLULAIRE : le "*patch-clamp*"

La technique du patch clamp est une méthode électrophysiologique permettant l'enregistrement de courants macro ou microscopiques au travers la membrane plasmique d'une cellule unique, lors de l'application d'un potentiel imposé. La technique du patch clamp a été mise au point en 1976 par Erwin Neher et Bert Sakmann pour enregistrer des courants en canal unitaire (microscopique) sur des fibres musculaires dénervées de grenouille. Cette technique repose sur les capacités d'interactions et d'adhérences d'une micropipette de verre avec les lipides membranaires. La pipette, dont le diamètre à l'extrémité est de l'ordre du μm , forme un contact électrique hautement résistant appelé « *Seal* », isolant ainsi sous sa pointe une petite portion de membrane plasmique appelée « *patch* ». On estime la qualité du scellement par la résistance de Seal qui doit être supérieure à $1\text{ G}\Omega$, on parle alors de « *Gigaseal* ». Cette micropipette de verre est remplie d'un milieu intrapipette (MIP) de composition connue jouant le rôle de microélectrode permettant à la fois de contrôler le potentiel de membrane et d'enregistrer les courants. La technique de « Improved patch clamp », ou technique du patch clamp amélioré, et ses configurations, ont été décrites en détails par Hamill (Hamill, Marty et al. 1981).

1. Les différentes configurations de "patch-clamp"

Hamill *et al.* (1981) ont initialement décrit quatre configurations de la technique du patch clamp (**Figure 39**)(Hamill, Marty et al. 1981). Lors de l'obtention du Gigaseal, il est possible d'enregistrer les courants microscopiques dus à l'activité des canaux ioniques présents dans le morceau de membrane placé sous la pipette. Il s'agit alors de la première configuration possible de la technique du patch clamp : la configuration *cell-attached* (cellule attachée). A partir de cette configuration, il est possible de rompre le morceau de membrane, précédemment isolé, en exerçant une brève pression négative à l'intérieur de la pipette suivi d'un retour à la pression normale. Le patch peut être également rompu par l'application d'un choc électrique (« zap »), de haut voltage et de faible durée, déstabilisant les phospholipides chargés de la membrane. Nous sommes alors en configuration *whole-cell* (*cellule entière*) aussi appelée *ruptured patch* ou patch rompu.

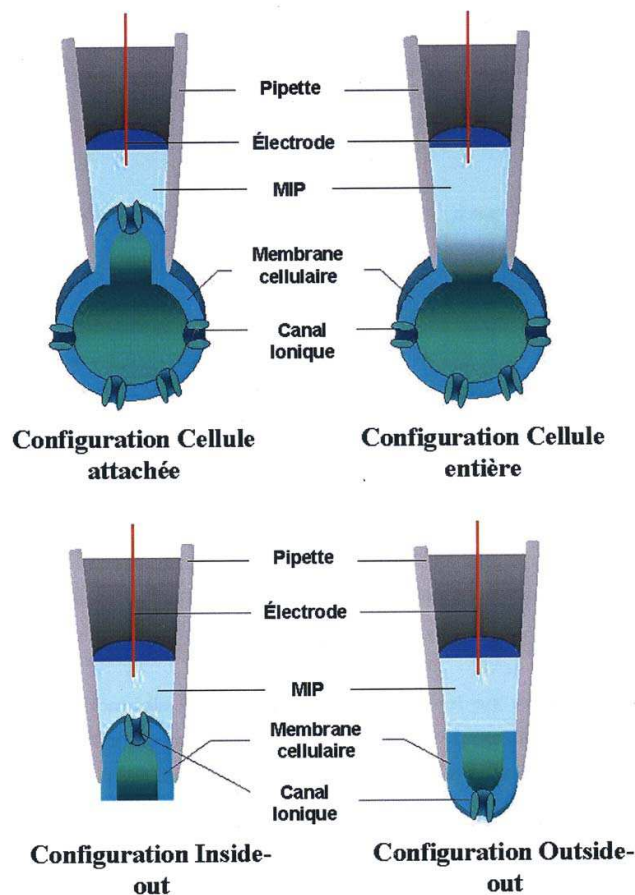


Figure 39 : Schéma des quatre principales configurations de la technique du patch-clamp. Cellule attachée, Cellule entière, Inside-out, Outside-out. (Modifiée d'après l'image de Bo Skaaning Jensen©)

Dans ce cas, le milieu intracellulaire est dialysé par le milieu intrapipette dont la composition connue permet un contrôle du milieu intracellulaire. Ayant un accès électrique direct à l'intérieur de la cellule, il est alors possible d'enregistrer des courants macroscopiques correspondant à l'activité de l'ensemble des canaux ioniques de la cellule. Il est important de remarquer que la dialyse du milieu intracellulaire peut entraîner une perte d'éléments régulateurs des canaux et des voies de signalisations. Pour éviter cette perte des éléments du cytosol, la technique de patch perforé a été développée. Elle consiste à ajouter dans la solution intrapipette des antibiotiques de type nystatine ou amphotéricine B (Rae, Cooper et al. 1991), très hydrophobes en raison de leurs structures chimiques. Ces antibiotiques sont capables de s'insérer dans les membranes cellulaires pour constituer des pores qui assurent une parfaite conduction électrique entre le milieu intrapipette et intracellulaire par la diffusion spécifique de cations et anions monovalents, mais en excluant toute dialyse entre le cytoplasme et le milieu intrapipette. Les deux autres configurations sont appelées patch excisé, *inside-out* et *outside-out*, respectivement obtenues à partir de la configuration *cell-attached* et *patch rompu*. Ces deux configurations permettent l'enregistrement de courants unitaires provenant de l'activité de quelques canaux ioniques présents dans le morceau de membrane excisé. La configuration *outside-out* est obtenue en éloignant doucement la micropipette après la réalisation du patch rompu. En se rompant, la membrane forme une vésicule dont le côté exposé au bain est le côté extracellulaire et dont le morceau de membrane situé sous l'extrémité de la pointe de la pipette est rompu. La configuration *inside-out* est obtenue en éloignant brutalement la pipette de patch, à partir de la configuration *cell attached*, de manière à conserver seulement le morceau de membrane isolé sous la pipette et dont la face interne de la membrane est en contact avec le bain. Pour toutes ses configurations l'enregistrement des courants ioniques se fait en mode «*voltage-clamp*» ou voltage imposé. Aussi, il est possible de mesurer le potentiel de membrane de repos des cellules : on parle alors de «*current-clamp*» ou courant imposé.

2. Propriétés électriques passives de la membrane plasmique

La configuration cellule entière de patch rompu permet la mesure des propriétés électriques passives de la membrane (**Figure 41**).

- La **capacité membranaire (C_m)** de la bicouche lipidique donne une bonne estimation de la surface lipidique. Elle est exprimée en pF et est calculée à partir des courants capacitifs enregistrés lors d'un créneau de potentiel.

- La **résistance membranaire (R_m)** qui permet d'estimer la perméabilité de la membrane aux ions au repos.

- Le **potentiel de membrane de repos** ou **potentiel de membrane (E_m)** qui est enregistré en mode «*current-clamp*» par l'amplificateur

3. Dispositif expérimental

L'installation de patch clamp repose sur une table anti-vibrante (Ealing, USA) et l'isolation électrique est assurée par une cage à Faraday reliée à la terre. La boîte de pétri, contenant les cellules, est placée sur une plaque de plexiglas installée sur la platine d'un microscope inversé (Nikon, Eclipse TE 300). La pipette de patch est approchée de la cellule grâce à l'utilisation d'un micromanipulateur piézoélectrique (TS-5000-300, Burleigh, USA). Un micromanipulateur hydraulique (MMN-1, Narishige, Japon) assure l'approche de la tête de périfusion au dessus de la cellule. Ce système est relié à six capillaires permettant la perfusion de différentes solutions expérimentales. La pipette de patch, c'est l'électrode de mesure. Elle est remplie de milieu intrapipette et installée sur le portoir de la tête de l'amplificateur de patch. Un fil d'argent chloruré baigne dans le milieu intrapipette et assure la connexion électrique au système d'amplification et d'enregistrement.

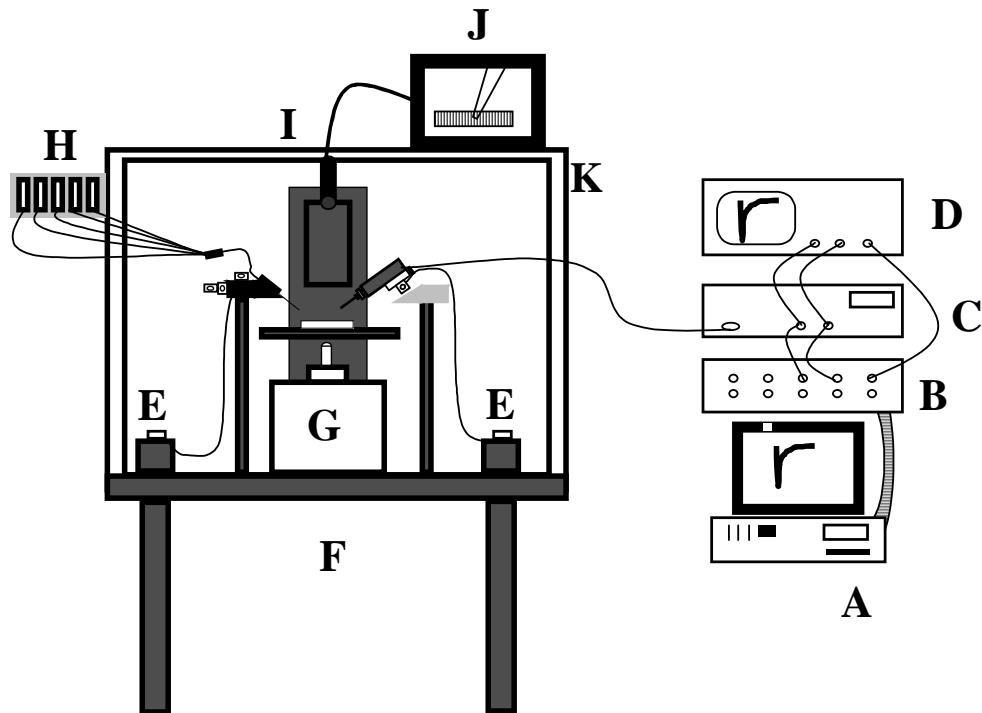


Figure 40 : Représentation schématique de l'installation de patch clamp. A. micro-ordinateur, B. convertisseur analogique/numérique et numérique/analogique, C. amplificateur de patchclamp, D. oscilloscope, E. micromanipulateurs, F. table anti-vibration, G. microscope inversé, H. système de périfusion, I. caméra CDD, J. moniteur vidéo, K. cage à Faraday.

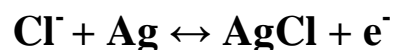
L'électrode de référence est plongée dans le milieu extracellulaire de manière à fermer le circuit électrique. Ces deux électrodes sont connectées à l'amplificateur de patch clamp (Axopatch 200-B, Axon Instruments, USA) qui assure la conversion courant-tension : il amplifie le courant mesuré après l'avoir converti en tension. L'amplificateur est lui-même relié à une interface qui assure la conversion analogique/numérique (Digidata 1322A, Axon Instruments, USA), qui transmet le signal converti à un ordinateur. Cette interface permet la conversion de la tension, une mesure physique, en un signal numérique pouvant être intégré et analysé par l'ordinateur (**figure 40**).

Les courants sont filtrés par un filtre Bessel à une fréquence de 2 kHz et sont échantillonnés à une fréquence de 10 kHz. Un oscilloscope numérique (Tektronix TDS 310, USA) permet la visualisation directe des courants enregistrés et du voltage imposé. Les expériences sont réalisées à température ambiante. L'imposition du voltage ainsi que la visualisation et l'enregistrement des courants sont assistés par ordinateur et pilotés par le logiciel pClamp 9.0 (Axon Instruments, USA). La stimulation et l'acquisition se fait avec

Clampex et Clampfit permet l'analyse des données. Les graphiques et les courbes sont réalisés grâce au logiciel Origin Microcal 7.0 (Microcal Software, USA).

4. Fabrication des pipettes de "*patch-clamp*"

L'électrode est l'interface indispensable entre la cellule et le dispositif d'enregistrement. Elle a pour rôle de convertir un courant de nature ionique en un courant purement électrique. Pour ce faire, l'électrode est constituée d'une pipette de verre, contenant une solution ionique dans laquelle baigne un fil d'argent chloruré. Tous les mouvements ioniques générés par la cellule sont transmis dans la micropipette par le biais de la solution saline et conduits dans le fil d'argent par simple oxydo-réduction conformément à l'équation suivante :



Pour conduire le mieux possible la propagation des courants ioniques sur le fil d'argent, la chloruration doit être la plus parfaite possible. Elle est effectuée par trempage du fil d'argent dans l'eau de javel (hypochlorite de sodium). Cette méthode présente l'avantage d'être rapide et peu coûteuse. La pellicule de chlorure d'argent ainsi formée est relativement fine et homogène. Il faut cependant répéter l'opération régulièrement. La qualité de la mesure que l'on désire effectuer est également dépendante de la qualité de l'accolement de la micropipette à la membrane de la cellule, c'est-à-dire à la qualité du Gigaseal. Son obtention est la résultante de plusieurs facteurs dont :

- La propreté de la membrane.
- La nature de verre utilisé.
- La géométrie des pipettes, qui dépend du type de verre utilisé et des caractéristiques de l'étirage.

Il existe plusieurs types de verres qui diffèrent par leur température de fusion, leur constitution chimique ou encore leur propriété électrique. Le choix du verre se fait alors en fonction de la facilité à établir un scellement de haute résistance avec la membrane cellulaire ainsi qu'un bon accès électrique lors de la rupture du patch après aspiration. La résistance électrique de la pipette, mesurée lorsque celle-ci est remplie de milieu intrapipette et plongée

dans le milieu extracellulaire, est un indicateur de la taille de la pointe de la pipette. Plus elle est grande plus la pointe est fine et plus le diamètre est petit. Ainsi la résistance de pipette (R_p) ne doit pas être trop élevée pour ne pas avoir une résistance d'accès trop grande, ni trop faible ce qui rend le « seal » difficile à obtenir. La résistance des pipettes utilisées est généralement comprise entre 4 et 7 M Ω . Les pipettes que nous utilisons sont fabriquées à partir de verre de borosilicate, verre dur (GC150F-15 Harvard apparatus, UK). A l'opposé, le verre hématocrite est dit verre mou. Sa structure irrégulière lui confère une température de fusion faible facilitant l'étirage. Avec ce type de verre il est facile d'obtenir une forme de pointe de pipette souhaitée. Ce type de pipette présente l'avantage d'obtenir rapidement un scellement à la membrane très rapide et de bonne qualité. Cependant, la capacité générée par ce type de verre est très élevée ce qui peut altérer la qualité des signaux enregistrés. Contrairement au précédent, le verre dur possède une structure très régulière qui lui confère une très haute température de fusion conduisant à l'obtention de pipettes de formes plus allongées et par conséquent une résistance d'accès plus élevée. Néanmoins, sa conductivité électrique est nettement plus faible et peut être facilement compensée. En effet, sa paroi beaucoup plus épaisse, génère une capacité plus faible que le verre mou. Les électrodes sont fabriquées par la technique du double étirage à l'aide d'une étireuse verticale (Narishige, Japon, PP-830).

5. Solutions expérimentales

Compte tenu de la diversité des canaux ioniques, pompes et autres transporteurs que l'on trouve sur la surface des membranes cellulaires, il convient de choisir judicieusement la composition des solutions expérimentales. Une solution physiologique expérimentale doit répondre à certaines caractéristiques :

- Elle doit respecter l'iso-osmolarité de part et d'autre de la membrane.
- Elle doit respecter les conditions de pH physiologiques.
- La membrane cellulaire étant très affine pour les ions divalents, il est indispensable de bien contrôler leurs concentrations, pour le cas de la solution extracellulaire. Selon la concentration des divalents utilisés, un masquage des charges de surface peut avoir lieu. Cet effet risque d'avoir des conséquences sur la sensibilité apparente vis-à-vis du potentiel, des canaux ioniques (Hilles, 1984 ; 1992).

5.1 Solutions extracellulaires

Lors de l'étude électrophysiologique des cellules, le milieu de culture contenant des protéines et facteurs de croissance peut perturber l'établissement du « seal ». Il est par conséquent rincé et substitué par une solution saline physiologique de préservation appelée PSS (Physiological Saline Solution) dont la composition est reportée dans le tableau ci-dessous. Le PSS nous permet de contrôler totalement les concentrations en ions et donc leurs potentiels d'équilibre. Les bloqueurs pharmacologiques utilisés ou autres molécules utilisées sont diluées à la concentration désirée dans le PSS et perfusés dans le milieu extracellulaire au contact proche de la cellule.

Composition de différentes solutions extracellulaires

| | PSS | PSS I _{CRAC} | PSS 0Ca ²⁺ |
|-------------------|-----|-----------------------|-----------------------|
| NaCl | 140 | 140 | 140 |
| CaCl ₂ | 2 | 10 | - |
| MgCl ₂ | - | | 2 |
| KCl | 5,4 | 5,4 | 5,4 |
| HEPES | 10 | 10 | 10 |
| D-(+)-Glucose | 11 | 11 | 11 |
| EGTA | - | | 1 |

Tableau 7 : Composition des différentes solutions extracellulaires utilisées (en mM). Le pH est ajusté à 7,4 avec NaOH pour PSS et PSS 0-Ca²⁺.

5.2 Solutions intracellulaires

Lors de l'étude électrophysiologique des cellules par la configuration patch rompue du patch clamp, le milieu intrapipette (MIP) utilisé est une solution saline, conductrice, qui va dialyser le milieu intracellulaire et doit par conséquent être le proche possible de celui-ci. Les compositions ioniques des cellules cancéreuses mammaires ou pulmonaires n'ayant jamais été décrites, nous avons utilisé une solution de composition classiquement utilisée pour ce type

d'étude : le milieu contient de l'ATP, pas d'ions Ca^{2+} et un chélateur calcique, l'EGTA. Nous pouvons alors qualifier ce milieu de « MIP à pCa non contrôlée », pour lequel le Ca^{2+} présent est apporté par les traces contenues dans les différentes poudres utilisées mais dont l'activité n'est pas déterminée. Par la suite nous avons utilisé des MIP dont l'activité calcique a été contrôlée par l'établissement d'un tampon entre l'EGTA et l'apport de Ca^{2+} . Nous avons alors qualifié le MIP par sa concentration calculée de calcium libre, **pCa X**, indiquant une activité calcique de : $(\text{Ca}^{2+}) = 10^{-X} \text{ M}$. (Tableau 8)

Composition de différents milieux intracellulaires

| | MIP pCa non contrôlée | MIP pCa 7 | MIP pCa 6,4 | MIP CRAC |
|-------------------|-----------------------|-----------|-------------|----------|
| K-glutamate | 110 | 125 | 125 | 135 |
| KCl | 10 | 20 | 20 | - |
| NaCl | 10 | - | - | 10 |
| MgCl ₂ | 1 | 1 | 1 | 1 |
| CaCl ₂ | - | 0,37 | 0,7 | - |
| Mg-ATP | 1 | 1 | 1 | 1 |
| EGTA | 10 | 1 | 1 | - |
| HEPES | 10 | 10 | 10 | 10 |
| BAPTA | - | - | - | 10 |

Tableau 8 : Composition des milieux intrapipette (MIP) utilisés en configuration patch rompu. Le pH est ajusté à 7,2 avec du KOH.

6. Protocoles expérimentaux

Les courants ioniques sont générés par des protocoles de rampe (déplacement rectiligne du potentiel de membrane) de -120 à + 50 mV à partir d'un potentiel de maintien (« holding ») de -70mV, à une fréquence de 0,5 Hz et d'une durée de 500 ms. Ce protocole dit de rampe, nous permet d'étudier les courants ioniques présents dans les cellules. Le protocole

de dépolarisations successives nous permet de construire les courbes de relation courant-voltage (courbe I-V). Ces dernières sont obtenues en mesurant l'amplitude moyenne du courant (en pA/pF pour s'affranchir du paramètre taille de cellule) en isolant les traces les plus représentatives.

L'amplitude du courant est alors normalisée à la capacité membranaire de la cellule (pF) et les courants sont exprimés en densité de courant (pA/pF). Les densités de courant enregistrées lorsque la cellule est perfusée avec du PSS sont définies comme condition contrôle.

7. Limites de la technique de "*patch-clamp*"

7.1 "Run-down"

En configuration cellule entière, on observe quelque fois au cours d'une expérimentation et en fonction du temps, une diminution de l'amplitude du courant. Cela est la conséquence de la dilution du milieu intracellulaire par le milieu intra-pipette entraînant la perte de molécules régulatrices du canal. Cet effet peut être limité par l'utilisation de la configuration en patch perforé.

7.2 Artefacts membranaires

Les membranes cellulaires sont constituées d'une bicouche phospholipidique et de protéines transmembranaires. Cette structure leur confère des propriétés électriques que l'on schématise classiquement par une succession d'éléments, constitués par une capacité (C_m) correspondant aux phospholipides, mise en parallèle avec une résistance membranaire (R_m) correspondant aux protéines et plus particulièrement aux canaux ioniques qui nous intéressent. Cependant, dans le système d'enregistrement à simple électrode, la résistance de la pipette (R_p) s'ajoute au schéma initial de la membrane. La résistance de pipette est corrélée au diamètre de l'ouverture de sa pointe. A la formation de Giga-seal, la portion de membrane située sous la pipette forme une vésicule à l'embouchure de cette pipette. Lors de la rupture de cette vésicule, par pression négative, l'embouchure de la pipette se retrouve tapissée de membrane réduisant par la même l'accès électrique au milieu intracellulaire. Cela se traduit

électriquement par une résistance, appelée résistance d'accès (R_a) qui s'ajoute à la R_p : la somme des deux est classiquement appelée résistance série (R_s) (**Figure 41**).

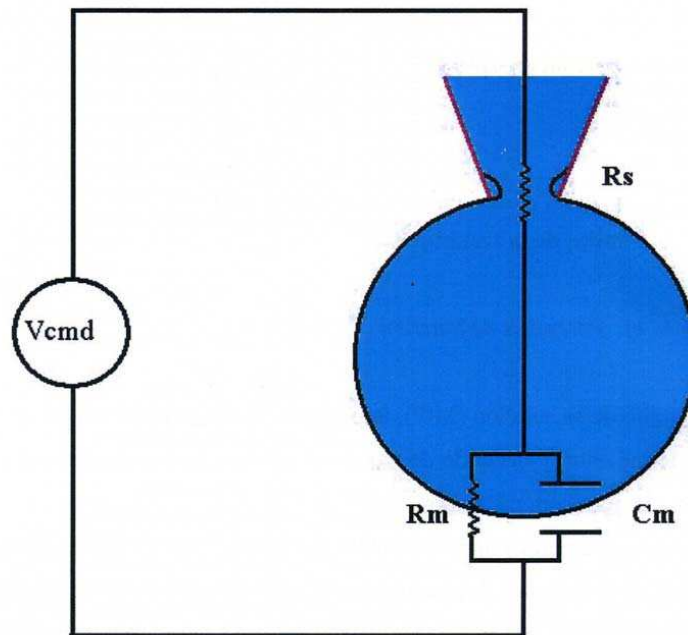


Figure 41 : Schéma simplifié d'une cellule en configuration cellule entière et du circuit électrique équivalent à une portion de membrane. R_m correspond à la résistance de membrane et C_m à la capacité membranaire. V_m est le voltage membrane mesuré. R_s représente les résistances séries. V_{cmd} est le potentiel de commande.

Les R_s entraînent alors une erreur dans la lecture membranaire du potentiel imposé et par conséquent du courant mesuré. La seule composante que l'on souhaite mesurer dépend de la résistance membranaire. La capacité membranaire et les résistances séries sont alors des composantes contaminantes. Les capacités membranaires mais aussi celle de la pipette (variant en fonction de l'épaisseur et de la composition de verre) induisent un temps de charge et de décharge, qui, en présence des R_s , induit une déformation du créneau de voltage imposé à la cellule et un ralentissement de la cinétique d'imposition de ce potentiel.

Il est possible grâce aux fonctions de l'amplificateur de compenser les capacités de la membrane et de la pipette ainsi que les résistances séries. Les capacités sont compensées par addition d'un transitoire capacitif de même amplitude mais de polarité opposée. Les résistances séries induisent une erreur de la lecture du potentiel de membrane associé à la capacité membranaire. D'après la loi d'Ohm, si l'on veut imposer un potentiel à la membrane (V_{cmd}), le potentiel vu par la membrane (E_m) sera $E_m = V_{cmd} - I_m R_s$ (I_m = Intensité membranaire). Il convient donc de compenser la résistance en série pour espérer que le

potentiel réellement vu par la membrane soit celui imposé par l'amplificateur. Aussi, le potentiel est imposé à la membrane non pas instantanément, mais avec un décours exponentiel, ou τ représente la constante de temps de cette phase. L'allure exponentielle de ce signal est inhérente à la présence de la capacité. Cependant, τ est proportionnel à C_m , R_s et R_m : $\tau = R_s C_m$. Il est possible de réduire les R_s grâce à l'amplificateur de patch qui va permettre un contrôle rétro-actif consistant à injecter dans la pipette de patch un signal correspondant à la différence de voltage existant entre le voltage de commande et celui perçu par la membrane.

VIII. MIGRATION EN TRANSWELL

Les cellules ayant été maturées ou non après 18 heures sont récupérées, lavées dans du RPMI seul (centrifugation à 600g pendant 5 min, à 20°C) avant d'être resuspendues dans un volume final de 1 mL de RPMI HSA 1%. Après comptage au bleu trypan, leur concentration est ajustée à $1,5 \cdot 10^6/\text{mL}$.

Evaluation de la migration

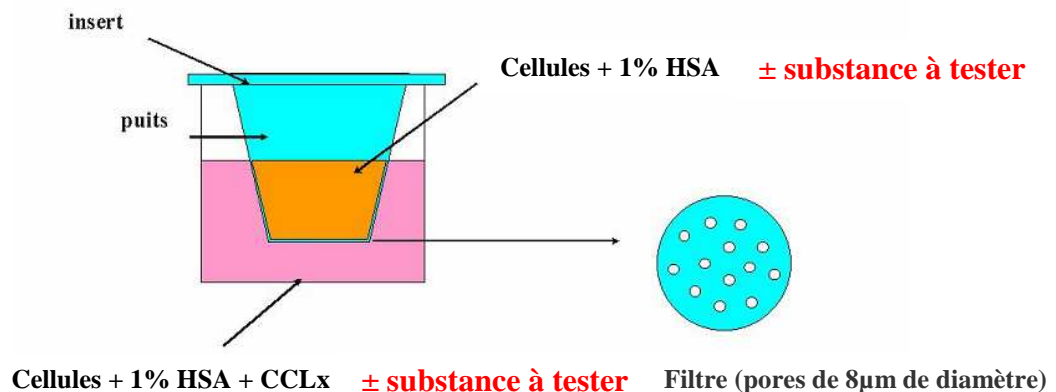


Figure 42 : Représentation schématique des tests de migration *in vitro*.
(D'après thèse de Sébastien ROGER, 2005)

Dans une plaque 24 puits, 600 µL de milieu attractant sont ajoutés dans le puits. Ce milieu contient en plus du RPMI-HSA 1% soit la chimiokine CCL5 (ligand du CCR5 à 50 ng/mL), soit CCL19 (ligand du CCR7 à 500 ng/mL). Dans les inserts, sont déposés 100 µL de cellules à une concentration de $1,5 \cdot 10^6/\text{mL}$. Les inserts sont ensuite placés rapidement dans

les puits correspondants (**Figure 42**). La plaque est ensuite placée à 37°C sous 5% CO₂ pendant 5 heures.

Après l'incubation, les cellules contenues dans les puits sont récupérées, celles qui ont adhéré sous l'insert sont récupérées par un lavage en RPMI. Les cellules contenues au dessus de la membrane polycarbonate de l'insert sont jetées. Les cellules récupérées sont centrifugées à 600 g pendant 5 min, à 20°C. Elles sont ensuite resuspendues dans 200 µL de volume final de PBS et sont comptées sur une cellule de Mallassez avec une dilution de facteur 2 dans du bleu trypan.

IX. TRANSFECTION CELLULAIRE TRANSITOIRE PAR DES ARN INTERFERENTIELS (TECHNIQUE DE SiRNA)

Lors de la mise au point de cette technique, nous avons établi des paramètres optimums de transfection (durée de la transfection, concentration de siRNA) nous permettant d'obtenir la plus grande efficacité de transfection. Toutes les valeurs mentionnées ci-après ont été définies pour un puits d'une plaque de 24 puits (BD Falcon[®], Becton Dickson, USA). Nous avons travaillé avec un volume réactionnel de 400 µL par conditions expérimentales.

Des si-RNA « pré-désignés » (Santa Cruz Biotech, USA), spécifique de STIM-1 (sc-76589) et de ORAI-1 (sc-76001), sont utilisés pour inhiber l'expression de ces protéines. Dans une plaque P24 (BD Falcon[®], Becton Dickson, USA), 4.10⁵ DC immature (DCi) sont mis dans chaque puits, dans 400 µL de milieu (Opti-MEM[®], Invitrogen, France) contenant 10% de SVF décomplémenté mais sans antibiotiques. De la Lipofectamine RNAi-Max[®] (1µL/puits ; Invitrogen, France) est diluée dans 50µL de milieu Opti-MEM[®] seul, 5 min avant de mélanger dans un volume équivalent de milieu 20 pmol de si-RNA. Après 20 min, 100 µL du mix Lipofectamine/si-RNA est ajouté aux cellules pour permettre la transfection proprement-dite. Du milieu frais (500 µL d'Opti-MEM[®] supplémenté avec 10% de SVF) est ajouté 4 heures après transfection à 37°C. Les cellules sont alors mises en culture pendant 36 heures à 37°C, en atmosphère humide. L'efficacité de l'extinction des protéines est contrôlée par RT-PCR et par western blot ou cytométrie en flux. Un siRNA, dont la séquence n'est complémentaire d'aucun ARNm connu, est utilisé comme contrôle négatif (si-Ctl ; Santa Cruz Biotech, USA, sc-37007).

X. STATISTIQUES

Les données sont exprimées en moyenne \pm l'erreur standard moyenne (n = nombre de cellules en patch clamp ou nombre d'expériences répétées en migration). L'analyse statistique, réalisée grâce au logiciel XLSTAT 2007, consiste en un test non paramétriques de Mann-Whitney considéré statistiquement significatif lorsque $p < 0,05$.

Résultats

Nous avons vu précédemment (chapitre II) que le rôle des cellules dendritiques est de filtrer les informations provenant de leur environnement pour en extraire les antigènes vis-à-vis desquels elles initieront, une fois activées, la réponse immune visant à éliminer le danger ou au contraire participer activement au maintien de la tolérance immune. Au stade immature de leur développement, les DC agissent comme sentinelles au niveau des tissus périphériques, sondant continuellement l'environnement antigénique. Toute rencontre avec certains produits provenant soit de micro-organismes, soit de tissus endommagés initie la migration et la maturation des DC vers les organes lymphoïdes secondaires. Lors de ce processus, l'antigène capturé dans un contexte identifié par la DC comme « danger » est apprêté pour être présenté par les molécules du CMH s à la surface de la cellule, aux cellules T effectrices.

Par ailleurs, comme toutes les cellules eucaryotes, le Calcium est un élément important à la vie cellulaire. Aucune cellule ne saurait exister sans une régulation de ses flux calciques. Le rôle du calcium a été très étudié dans les cellules excitables (cf Chapitre II) mais reste peu encore flou dans certains types cellulaires non-excitables. En effet, il peut servir à l'excrétion de protéines (cellules sécrétoires comme les cellules β -pancréatiques) mais également à la mobilité de certaines cellules (les cellules cancéreuses, par exemple) (Potier et al., 2006). Dans la suite de ce mémoire nous allons voir l'impact de cet ion, qu'est le Calcium, sur la physiologie et les fonctions de la cellule dendritique humaine.

Dans un premier temps, nous avons voulu voir si la modification du gradient de concentration du Ca^{2+} jouait un rôle sur les fonctions de la DC humaines. En effet, des études de caractérisation phénotypique du statut des DC humaines ont été menées en cytométrie en flux. Les DC humaines sont connues pour exprimer différents marqueurs à leur surface en fonction de leur état de maturation. Le phénotype mature se définit comme l'expression simultanée des marqueurs suivants : CD80, CD86, HLA-DR, CD83 et CD25. Nous avons donc évalué l'expression de ces marqueurs lors d'une période de culture en présence de concentrations croissantes de Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire. Une augmentation de la concentration calcique extracellulaire résulte en une augmentation de l'expression des marqueurs CD86 et CD83 (**Figure 43A**).

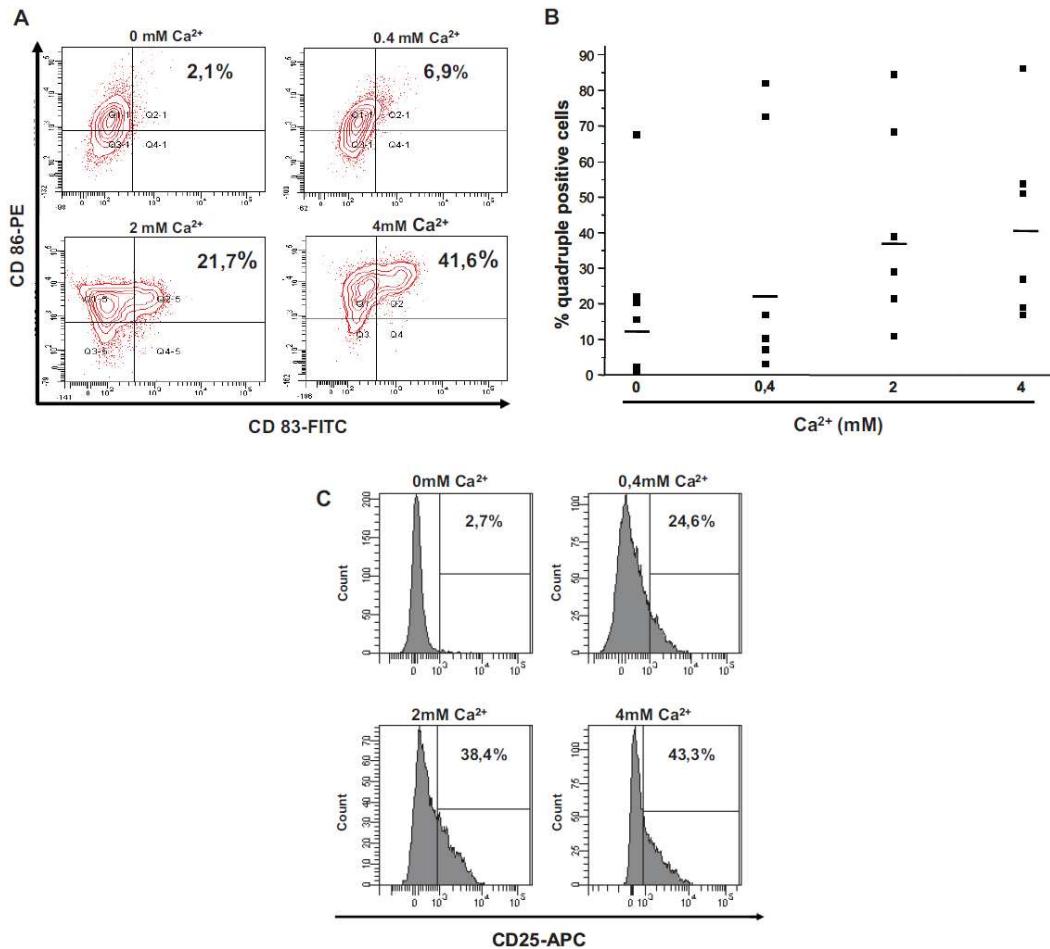


Figure 43 : Expression des marqueurs de maturation des DC humaines en fonction de la concentration extracellulaire en Ca^{2+} . Les cellules sont cultivées en milieux avec des concentrations calciques croissantes. A la fin de cette période de culture, elles sont récupérées et marquées pour leur caractérisation phénotypique en cytométrie en flux. **A** - *Le Ca^{2+} extracellulaire augmente l'expression du CD83 et du CD86.* La population présentée est issue d'un simple marquage par l'anticorps anti-DC-Sign. Dans cette population, l'expression de ces 2 marqueurs spécifiques (CD86 et CD83) est observée. Le pourcentage de cellules double positives est montré dans ce panel. Ces résultats sont représentatifs de 7 expériences indépendantes. **B** - *Expression des marqueurs de maturation en relation avec la concentration extracellulaire en Ca^{2+} .* La population, isolé à partir du simple marquage DC-Sign, exprime simultanément le CD80, le CD86, le HLA-DR et le CD83 dans des proportions croissantes en fonction des concentrations extracellulaires en Ca^{2+} . Le pourcentage des cellules quadruple positives est représenté dans le panel B. Chaque point représente une expérience et la barre noire, la moyenne de ces 6 expériences indépendantes. **C** - *Analyse de l'expression du CD25 après culture dans des milieux avec des concentrations croissantes en Ca^{2+} .* Les figures grises représentent l'expression du marqueur de surface: CD25. Les résultats sont représentatifs de 6 expériences.

Ensuite, nous avons analysé le pourcentage de cellules quadruple positives pour ces marqueurs (CD80, CD86, HLA-DR et CD83) (**Figure 43B**). Le pourcentage est augmenté en parallèle de celle de la concentration extracellulaire en Ca^{2+} (de 0 à 4 mM). Enfin, l'expression du marqueur de maturation, CD25, a été étudiée en simple marquage. Son expression est augmentée de 24,6 % à 43,3 % quand la concentration calcique passe de 0,4 à 4 mM (**Figure 43C**). Pour comparaison, seulement 2,7 % des DC humaines expriment le CD25 en absence de Ca^{2+} .

I. MISE EN EVIDENCE D'UNE ECC DANS LES CELLULES DENDRITIQUES HUMAINES

Dans le paragraphe précédent, nous avons vu que le Ca^{2+} seul, peut faire murer phénotypiquement les DC humaines. Il est donc vraisemblable que le calcium, du milieu extracellulaire, doit intervenir sur les voies de synthèse de ces marqueurs de surface. Il est également connu que le Ca^{2+} puisse servir de second messager. Mais, pour cela, il doit entrer dans la cellule par des différentes voies comme celle du mécanisme SOCE.

Nous avons donc étudié les événements calciques en réponse à une déplétion des stocks calciques induite par la Thapsigargine (TG), ou en réponse à des stimuli inflammatoires (activation par des agonistes des TLR ou par des cytokines inflammatoires) en microspectrofluorimétrie.

1. Induction d'une ECC en réponse à la Thapsigargine

Dans les types cellulaires, l'entrée capacitive de calcium (ECC) peut être enregistrée en induisant une déplétion des stocks calciques du RE par l'inhibition de la SERCA. Cette inhibition est induite par la TG. Cette déplétion induit l'activation des canaux CRAC, au niveau de la membrane plasmique. Une application de 750 nM de TG induit une ECC sensible au 2-APB (100 μM) (**Figure 44**).

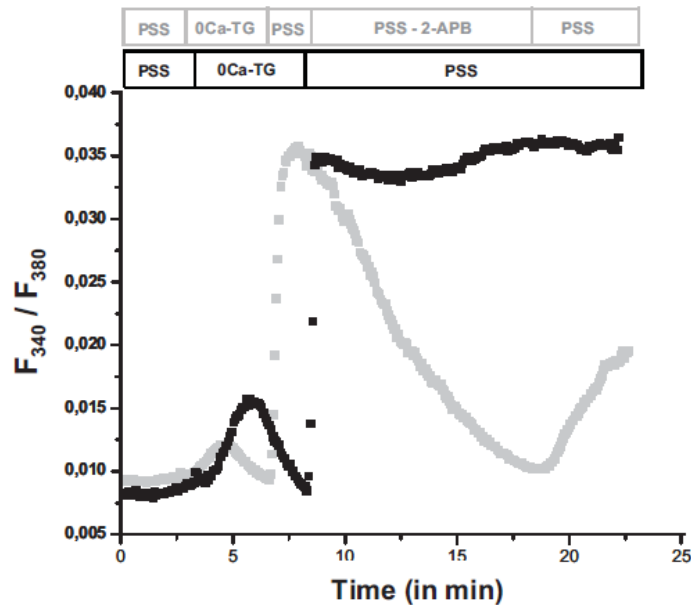


Figure 44 : Caractérisation de l'ECC dans les DC humaines. Les cellules sont exposées à la Thapsigargine (TG) en absence de Ca²⁺, ensuite le Ca²⁺ est réintroduit dans le milieu (2 mM). Une solution de 2-APB (100 μM) est alors perfusée. La réversibilité de l'inhibition est testée par une réintroduction du Ca²⁺ dans le milieu (2mM).

2. Caractérisation d'une ECC en réponse au LPS et au TNF-α

Les DC humaines peuvent être activées par différents agents exogènes (bactéries, virus) ou par des agents endogènes (cytokines...). Une stimulation par un agoniste des TLR, tel le LPS (à 50 ng/mL, agoniste de TLR-4), ou par une cytokine pro-inflammatoire, tel le TNF-α (20 ng/mL) va induire une augmentation de Ca²⁺ intracellulaire, soutenue et irréversible (**Figure 45A et B**). Pour démontrer la nature de cette entrée de Ca²⁺, une solution de solution physiologique (PSS) est perfusée avec 100 μM de 2-APB. Cette molécule va inhiber l'influx calcique induit par le LPS et par le TNF-α. Cette inhibition, par le 2-APB, n'est pas totale.

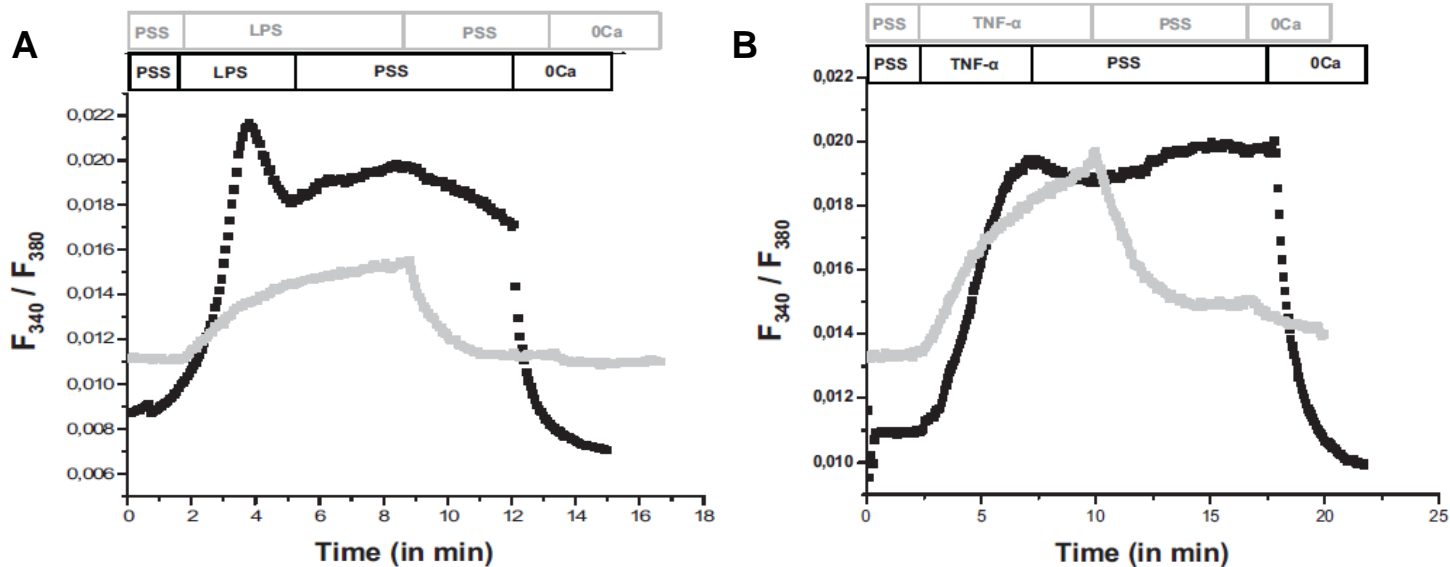


Figure 45 : Caractérisation de l'ECC durant les évènements précoces de maturation des DC humaines, traitées par le LPS ou le TNF- α . Les cellules sont exposées au LPS (50 ng/mL ; **A**) ou au TNF- α (20 ng/mL ; **B**). Ces stimulations induisent une ECC soutenue et irréversible. Cette ECC est sensible au 2-APB (100 μ M) (**Traces grises**). Ces résultats sont représentatifs de 7 expériences.

Par ailleurs, cet influx calcique est constitué de deux composantes, une continue et une transitoire, correspondant à une entrée de Ca^{2+} dans la cellule (sensible au 2-APB). Enfin, le 2-APB induit une réversibilité de cet influx calcique (**Traces grises, Figure 45**)

3. Caractérisation de l'ECC induite par le Zymosan

A contrario, lors d'une stimulation par le zymosan (agoniste de TLR-2, 25 μ g/mL), une augmentation transitoire et réversible de la concentration intracellulaire de calcium est observée (**Figure 46**).

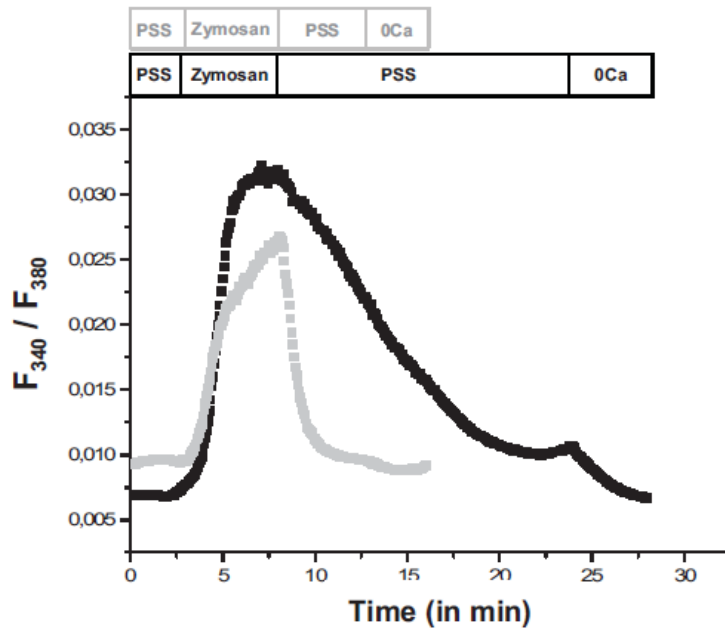


Figure 46 : Caractérisation de l'ECC durant les évènements précoces de maturation des DC humaines, traitées par le Zymosan. Les cellules sont exposées au Zymosan (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Cette stimulation induit une ECC transitoire et réversible. Cette ECC est sensible au 2-APB (100 μM) (Trace grise). Ce résultat est représentatif de 6 expériences.

De plus, une inhibition de l'amplitude de cette ECC est observée lors de l'application d'une solution PSS contenant 100 μM de 2-APB mais avec un effet moindre comparé à celui observé avec le LPS ou le $\text{TNF-}\alpha$.

4. Induction d'un courant calcique, I_{CRAC} , résultant de cette ECC

L'ECC induite par la TG, suite à une déplétion des stocks calciques, peut être mesurée par une autre technique : le « *patch-clamp* ». En effet, tout déplacement de charge au travers d'une membrane semi-perméable induit un courant. Nous avons donc analysé le courant résultant de cette entrée de calcium induite par la TG.

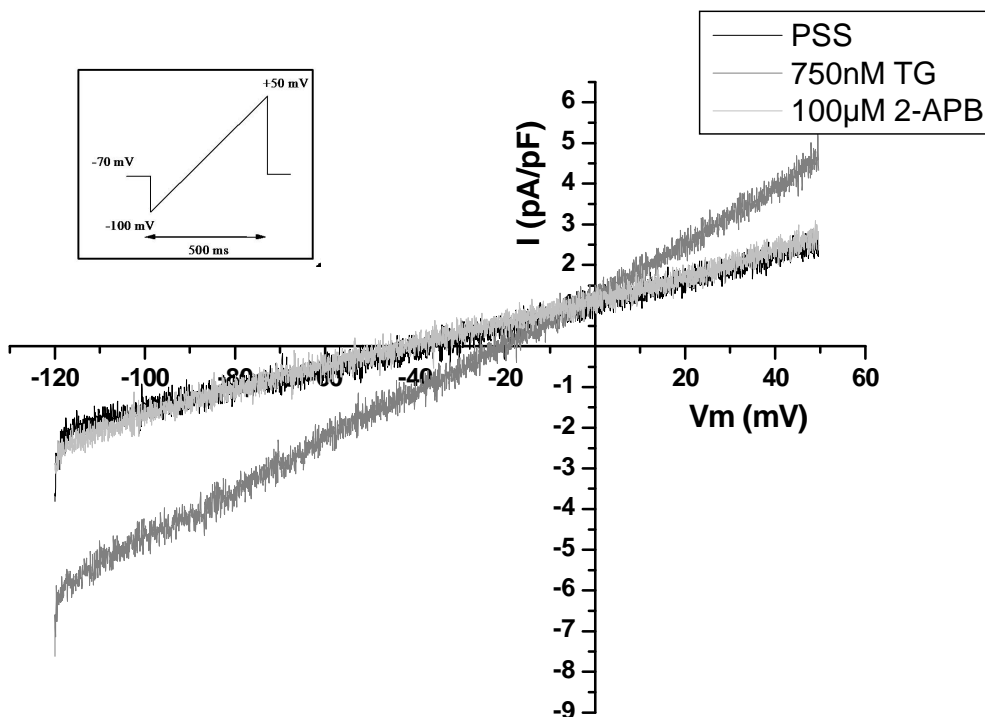


Figure 47 : Courant I_{CRAC} , d'une DC humaine, en réponse à l'application de TG. Un protocole de rampe de -120 à +50 mV en 500 ms (voir encadré) est appliqué sur les cellules dendritiques étudiées en configuration « cellule entière ».

II. IMPLICATION DE CETTE ECC DANS LES FONCTIONS DE LA CELLULE DENDRITIQUE HUMAINE

La DC humaine a une place privilégiée dans l'induction de la réponse immune. En effet, elle est en sentinelle dans les tissus périphériques où elle capte les antigènes : stade immature et ensuite elle les intègre et acquiert différentes propriétés durant la maturation. Comme nous l'avons précédemment, la maturation se traduit par une expression simultanée de marqueurs de surface. Mais, la DC humaine a d'autres fonctions comme la synthèse de cytokines et l'activation des lymphocytes T naïfs. Nous avons donc étudié l'implication de cette entrée de Ca^{2+} dans ces différentes fonctions.

1. Rôle de l'ECC dans l'expression des marqueurs de maturation phénotypique

La DC humaine exprime des marqueurs spécifiques lors de sa maturation : le CD80, le CD86, le HLA-DR et le CD83. Ce dernier semble être le plus sensible au Ca^{2+} . Nous avons donc évalué le pourcentage de cellules exprimant simultanément ces quatre marqueurs en présence ou non du 2-APB.

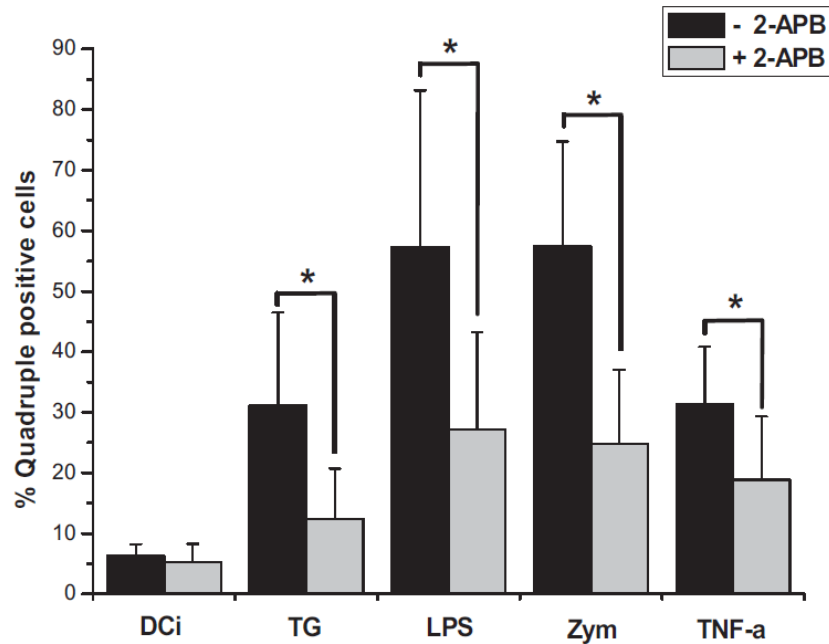


Figure 48 : Expression des marqueurs de maturation dans les DC humaines, en présence ou non du 2-APB. Les cellules sont cultivées, pendant 18 h, dans un milieu avec plusieurs agents de maturation (TG à 750 nM, LPS à 50 ng/mL, Zymosan à 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et TNF- α à 20 ng/mL) en présence ou non de 2-APB (100 μM). * $p < 0,05$, N=7

Dans les conditions contrôle (sans agent de maturation), les cellules, qui expriment simultanément les quatre marqueurs spécifiques de la maturation, représentent environ 6,3 %. Durant le 18 heures de maturation, l'expression de ces marqueurs est augmentée : 31,1 % pour la TG, 57,2 % pour le LPS, 57,3 % pour le Zymosan et 31,4 % pour le TNF- α (**Figure 48**). L'expression de ces quatre marqueurs est sensible au 2-APB (1000 μM ; $p < 0,05$). Cette expression est alors diminuée d'environ 50 %, dans toutes les conditions.

2. Rôle de l'ECC sur la capacité de sécrétion des cellules dendritiques humaines

La synthèse de cytokines est une des fonctions importantes des DC humaines. Ces molécules sont essentielles pour l'activation des lymphocytes T naïfs et pour leur orientation. Ces cytokines peuvent être dosées par la technique ELISA (quantitative) mais elles peuvent aussi être identifiées par des marquages intracellulaires en cytométrie en flux (qualitatif). Nous avons donc évalué la synthèse des cytokines comme l'IL-12, l'IL-10 et l'IFN- γ par la technique d'ELISA et par cytométrie en flux, avec l'IL-4 en sus.

2.1 Sécrétion de cytokines par les cellules dendritiques humaines

Après 18 heures de culture, les surnageants de culture sont récupérés pour ce dosage de cytokines.

Les DC humaines, traitées par la TG, sont incapables de sécréter aucune des cytokines analysées (**Figure 49**). Dans nos conditions, les DC humaines, traitées par le LPS sécrètent de l'IL-12 et de l'IL-10 alors que celles, traitées par le Zymosan, ne produisent que de l'IL-10. Ces sécrétions sont semblables à celles qui sont retrouvées dans la (Lagaraine, Hoarau et al. 2005; Lagaraine, Lemoine et al. 2008; Lemoine, Velge-Roussel et al. 2010). Ces sécrétions sont totalement inhibées par la présence du 2-APB (100 μ M) dans le milieu de culture (**Figure 49**), ou celle du SKF 96365, un autre inhibiteur de l'ECC (Résultats non montrés).

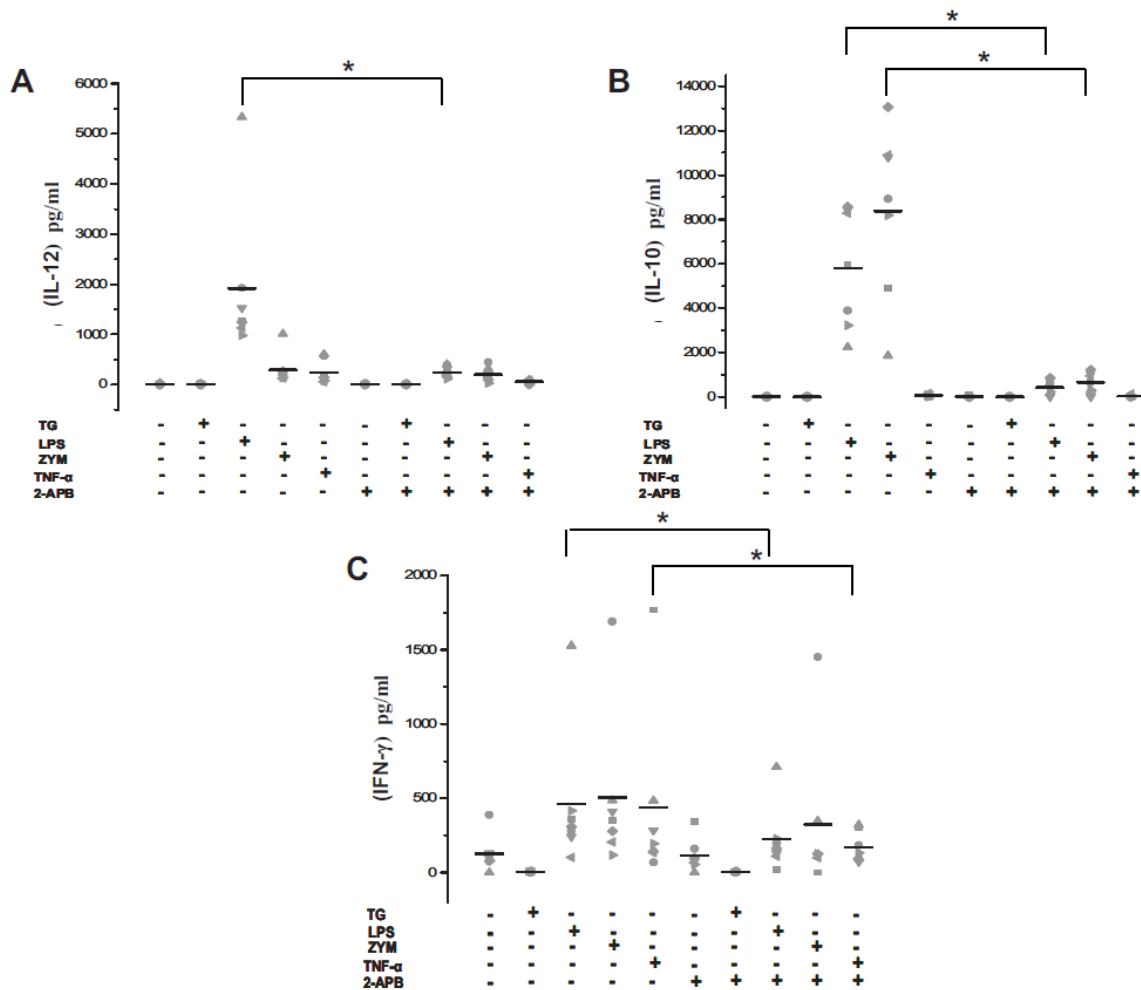


Figure 49 : Cytokines sécrétées par les cellules dendritiques humaines. A, B, C – L’IL-12, IL-10 et IFN- γ sont isolés des surnageants de culture de DC humaines traitées soit par la TG (750 nM), soit par le LPS (50 ng/mL), soit par le Zymosan (25 μ /mL) ou soit par le TNF- α (20 ng/mL), en présence ou non de 2-APB. Chaque point représente un donneur et la ligne noire, la moyenne de ces 7 expériences. (*p<0,05)

Enfin, la production d’IFN- γ , sécrété par les cellules traitées par le LPS et le TNF- α , est significativement réduite par l’addition du 2-APB au milieu de culture (**Figure 48** ; p<0,05).

2.2 Synthèse de cytokines par les cellules dendritiques humaines

La cytométrie en flux permet de détecter la synthèse des cytokines. En effet, il existe des anticorps monoclonaux dirigés vers les cytokines d'intérêt que sont l'IL-12, l'IL-10, l'IL-4 ou l'IFN- γ . Nous avons donc évalué leur synthèse dans nos conditions de culture. Après 18 heures de maturation, les DC humaines sont marquées en intracellulaire pour mettre en évidence leurs sécrétions.

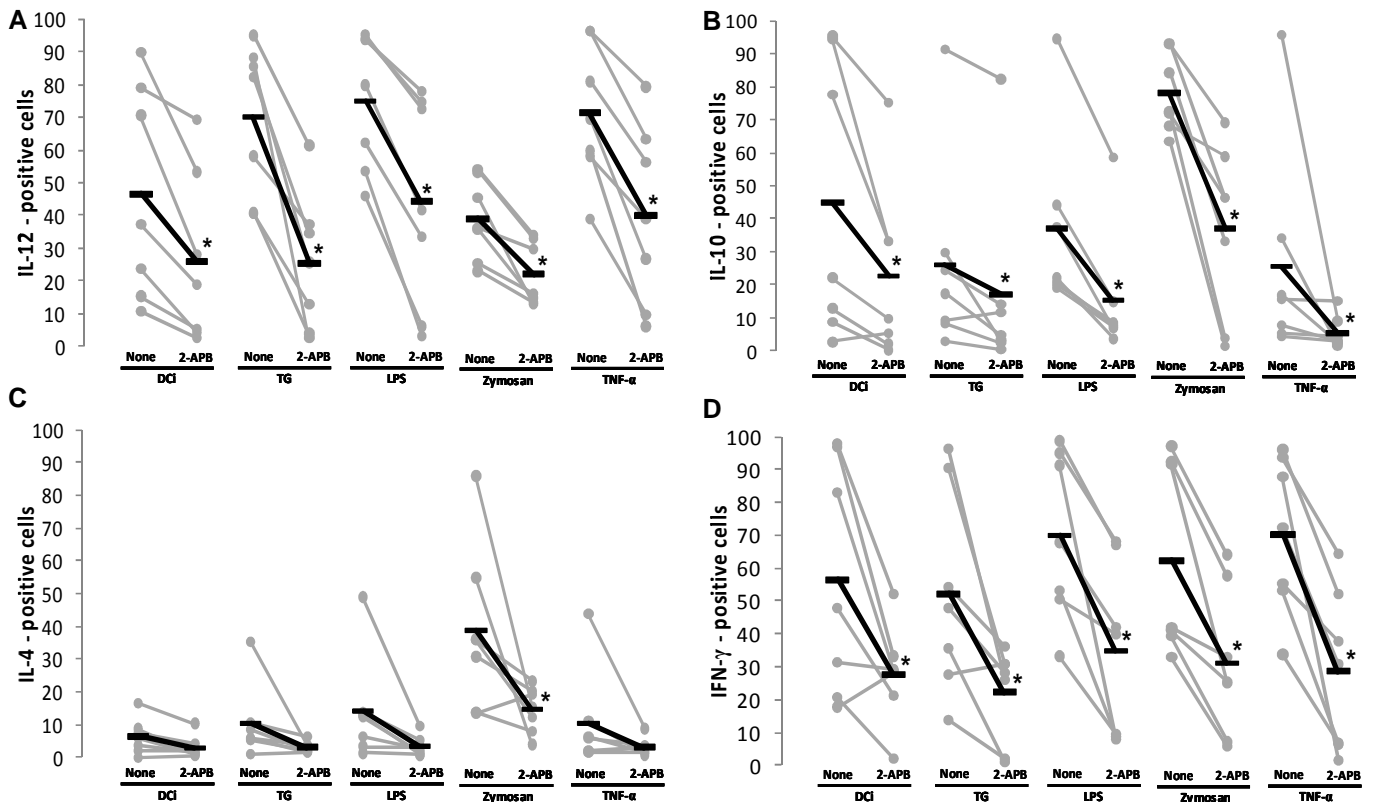


Figure 50 : Marquages intracellulaires des cytokines, dans des DC humaines. Les cellules sont récupérées, après 18 heures de maturation et sont marquées par des anticorps anti-cytokines.

La synthèse d'IL-12, d'IL-10 et d'IFN- γ (**figure 50B et D**) sont inhibées par le traitement au 2-APB (100 μ M) pour toutes les conditions de culture ($p < 0,05$) (**Figure 50A**). Au contraire, la synthèse d'IL-4 n'est significativement diminuée que dans la condition où les cellules sont maturées avec le Zymosan (**Figure 50C**). Il est à noter que les DC, traitées par la TG, sont capables de synthétiser des cytokines mais pas de les excréter (cf **Figure 49**). Pour conclure, l'action du 2-APB (réduction de l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule, joue un rôle prépondérant sur la synthèse des cytokines.

III. CARACTERISATION MOLECULAIRE DE L'ENTREE CAPACITIVE DE CALCIUM

L'Entrée Capacitive de Calcium (ECC) est un phénomène qui est assez connu dans certains modèles cellulaires, autres que les cellules dendritiques. En effet, de nombreux travaux ont été menés sur cet influx calcique dans des modèles de cancérologies (Motiani, Abdullaev et al. 2010) ou dans la cellule lymphocytaire T (Cahalan, Zhang et al. 2007). Il apparaît donc des candidats notoires pour expliquer ce mécanisme : le complexe ORAI et STIM. C'est pourquoi nous avons voulu visualiser la présence et comprendre le rôle de ce complexe (s'il est présent) dans les fonctions de la DC humaine. Nous avons donc mené des expériences de RT-PCR et de microscopie confocale pour montrer la présence de ces deux protéines dans les DC humaines.

1. Mise en évidence des ARN messager de ORAI-1 et STIM-1

La caractérisation moléculaire de cette ECC, durant la maturation des DC humaines, commence par la mise en évidence des ARN messagers des candidats notoires. Nous avons donc réalisé des RT-PCR semi-quantitative sur des ARN totaux de différentes conditions de culture.

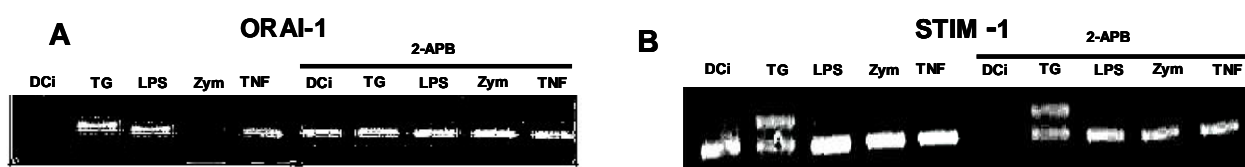


Figure 51 : ARN messagers de ORAI-1 et STIM-1 dans les DC humaines traitées par différents agents de maturation, en présence ou non de 2-APB. A - Analyse du profil d'expression des ARNm de ORAI-1, en réponse aux différents agents de maturation. Une expérience similaire est réalisée sur les ARNm de STIM-1 (panel B).

Le transcrite de ORAI-1 n'est pas exprimé par les DC immatures mais également dans les DC traitées par le Zymosan. Il est observé une expression, après 18 heures de culture, pour les conditions TG, LPS et TNF- α . De plus, ce transcrite est surexprimé dans toutes les conditions de culture, en présence de 2-APB (**Figure 51A**). Au contraire, le transcrite de STIM-1 est exprimé par les DC immatures et son expression ne semble pas modifiée par les

agents de maturation. Le traitement, par le 2-APB, n'affecte pas l'expression de ce transcrit, excepté dans les DC immatures dans lesquelles aucune trace du transcrit n'est détectée (**Figure 51B**). La RT-PCR est composée de 35 cycles pour ces deux transcrits. De plus, un nombre plus élevé de cycles pourrait entraîner une amplification non spécifique de transcrits. Donc, c'est pourquoi, nous nous sommes contentés de ce nombre de cycles pour ces expériences de PCR.

2. Expression et co-localisation de ORAI-1 et STIM-1 dans les cellules dendritiques humaines

Il ne suffit pas de mettre en évidence des ARN messagers pour affirmer que les protéines sont présentes dans les DC humaines. C'est pourquoi, nous avons réalisé des marquages immuno-histochimiques en microscopie confocale. Ces marquages nous permettent d'affirmer la présence des protéines ORAI-1 et STIM-1 dans les DC humaines mais également de visualiser les interactions possibles entre ces deux protéines.

Nous avons donc évalué l'expression des protéines ORAI-1 et STIM-1 dans les DC humaines par microscopie confocale. Dans la figure 51, les cellules sont fixées et marquées par les deux anticorps spécifiques de ces protéines (ORAI-1 en rouge et STIM-1 en vert). Ces deux protéines apparaissent co-localisées dans toutes les conditions, excepté celle avec le Zymosan. Dans les cellules traitées par le Zymosan, des « puncta » de ORAI-1 (en rouge) sont observés alors que STIM-1 ne semble pas détectée dans ces structures, qui sont distribuées de façon homogène dans les cellules (**Figure 52**).

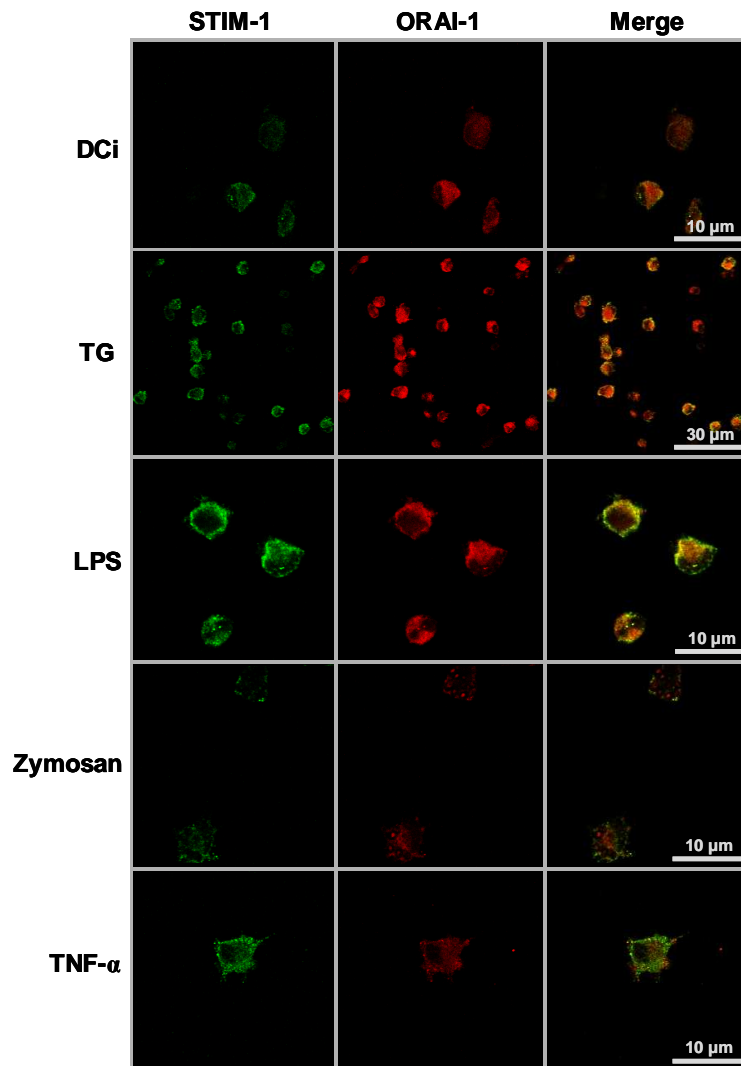


Figure 52 : Expression deORAI-1 et STIM-1 dans les DC humaines. L'expression est analysée par microscopie confocale, grâce à un marquage secondaire avec des anticorps secondaires couplés à l'Alexa Fluor®-488 pour STIM-1 (vert) et l'Alexa Fluor®-555 pour ORAI-1 (rouge).

3. Implication de ORAI-1 et STIM-1 dans les fonctions des cellules dendritiques humaines

Comme nous l'avons précédemment, l'ECC, induite par les différents de maturation, contrôle de nombreuses fonctions des DC humaines : la maturation et la synthèse de cytokines.

3.1 Rôle de ORAI-1 et STIM-1 dans l'ECC, dans les DC immatures

Dans un premier temps, nous avons testé le rôle de ces deux protéines (ORAI-1 et STIM-1) dans l'ECC, induite par la TG, dans les DC immatures. Nous avons transfecté des si-RNA, spécifiques de ces deux protéines, pour inhiber leur expression.

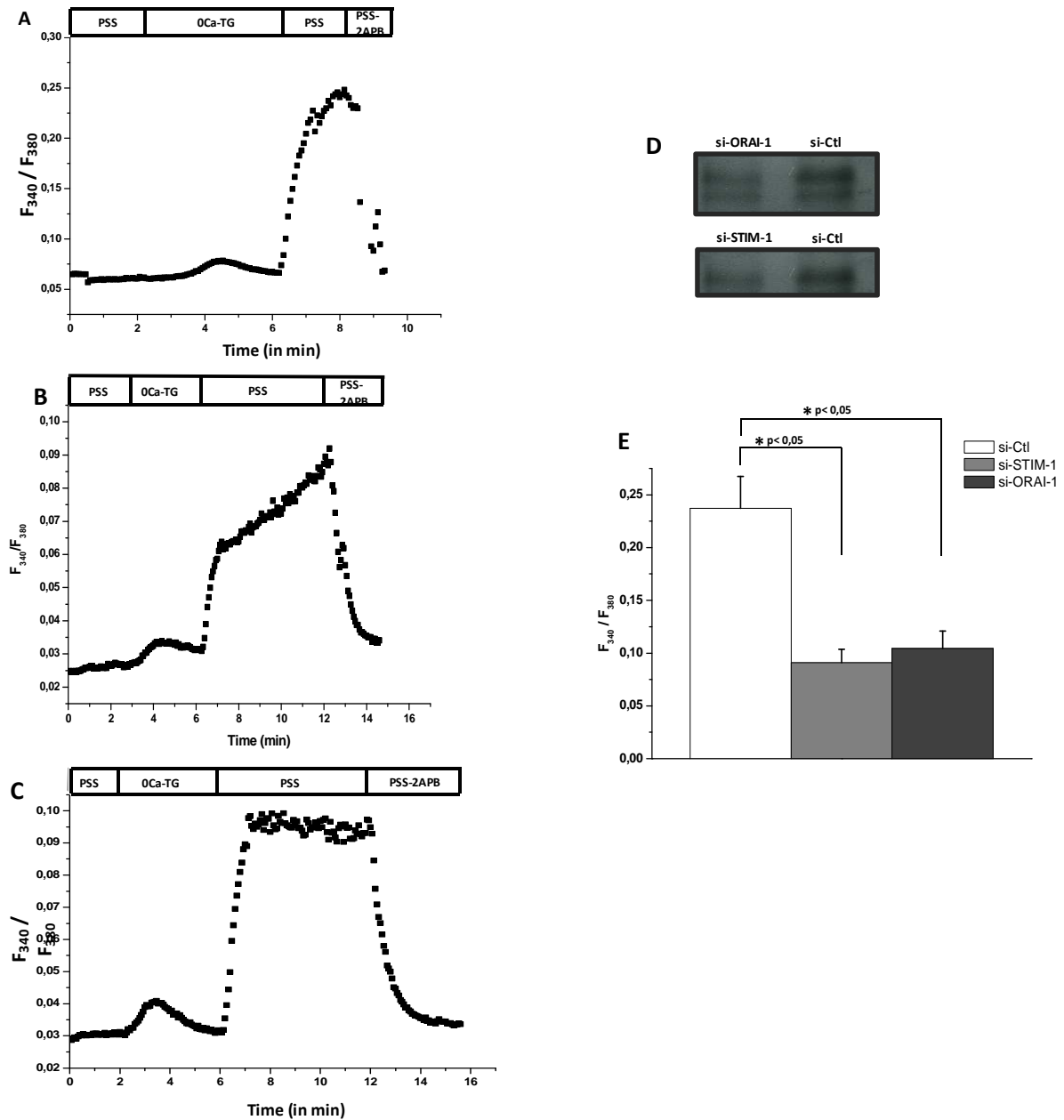


Figure 53 : Implication de ORAI-1 et STIM-1 dans l'ECC, induite par la TG, dans les DC immatures. Les cellules sont traitées par des si-RNA spécifiques (si-Ctl en C, si-STIM-1 en A et si-ORAI-1 en B). Dans les cellules si-CTL, la TG induit une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} , lors de la réintroduction du Ca^{2+} dans le milieu. Cette augmentation est inhibée dans les cellules traitées par le si-ORAI-1 (B) et le si-STIM-1 (A). Ces résultats sont représentatifs de 5 expériences indépendantes.

Nous avons, dans un premier temps, regardé l'effet de la transfection sur l'ECC, induite par la TG (**Figure 53**). Après la perfusion d'une solution libre en Ca^{2+} contenant 750 nM de TG, le Ca^{2+} est réintroduit et une ECC est observée (F340/F380 aux environs de 0.25). Cette ECC a les mêmes caractéristiques que celle représentée dans la figure 43. Dans les conditions de si-STIM-1, l'ECC est inhibée d'environ 55 % (F340/F380 aux environs de 0.09) (**Figure 53**). De plus, l'amplitude de l'ECC, dans les cellules traitées par le si-ORAI-1, est inhibée de façon équivalente (F340/F380 aux environs de 0.1) (**Figure 53**).

3.2 Rôle de ORAI-1 et STIM-1 dans l'expression des marqueurs de maturation phénotypique

La maturation des DC humaines se traduit par une expression concomitante de marqueurs de surface (CD80, CD86, HLA-DR, CD83 et CD25). Nous avons, donc, mis en évidence le rôle des protéines ORAI-1 et STIM-1 dans ces phénomènes de maturation, c'est-à-dire dans l'expression des marqueurs de surface.

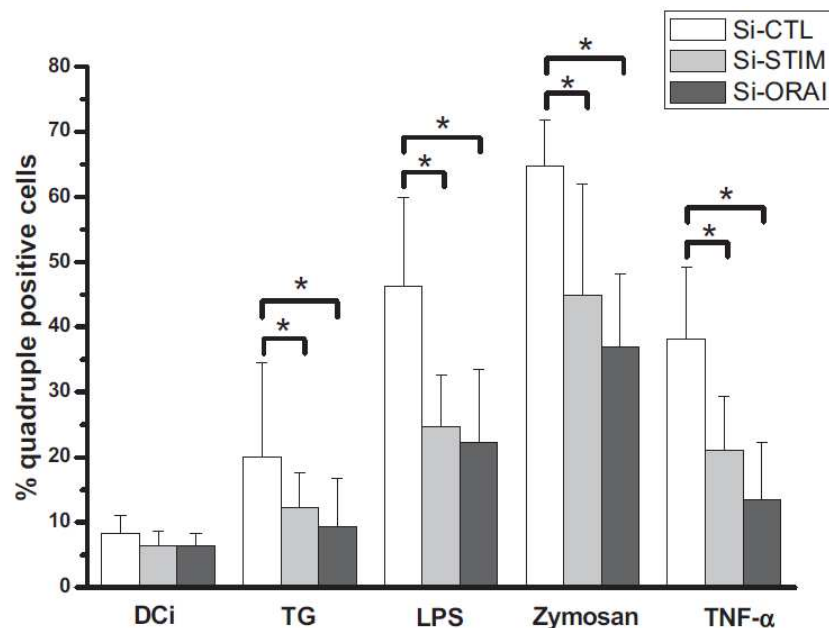


Figure 54 : Rôle de ORAI-1 et STIM-1 dans l'expression des marqueurs de maturation. Les cellules, traitées par le si-Ctl (blanc), le si-STIM-1 (gris clair) ou le si-ORAI-1 (gris foncé), sont cultivées pendant 18 heures, en présence des différents agents de maturation (TG à 750 nM, LPS à 50 ng/mL, Zymosan à 25 µg/mL et TNF-α à 20 ng/mL). Les cellules sont ensuite marquées et analysées en cytométrie en flux. (*p<0,05)

L'implication de ORAI-1 et STIM-1 dans les phénomènes de maturation des DC humaines a été analysée par une étude en cytométrie en flux. L'augmentation du nombre de cellules quadruple positives, représentée à la figure 47, est diminuée par les traitements avec le si-STIM-1 et le si-ORAI-1, pour toutes les conditions de maturation (**Figure 54**).

cf Annexe 1 : Article soumis dans The Journal of Immunology début Novembre 2010

3.3 La synthèse d'IFN- γ est sous la dépendance du complexe ORAI-1 et STIM-1

Comme la sécrétion de cytokines est une fonction-clé de la DC humaine, nous avons étudié l'effet d'inhibition de l'expression des protéines ORAI-1 et STIM-1 sur la synthèse de cytokines. La production d'IFN- γ est dosée par la technique ELISA.

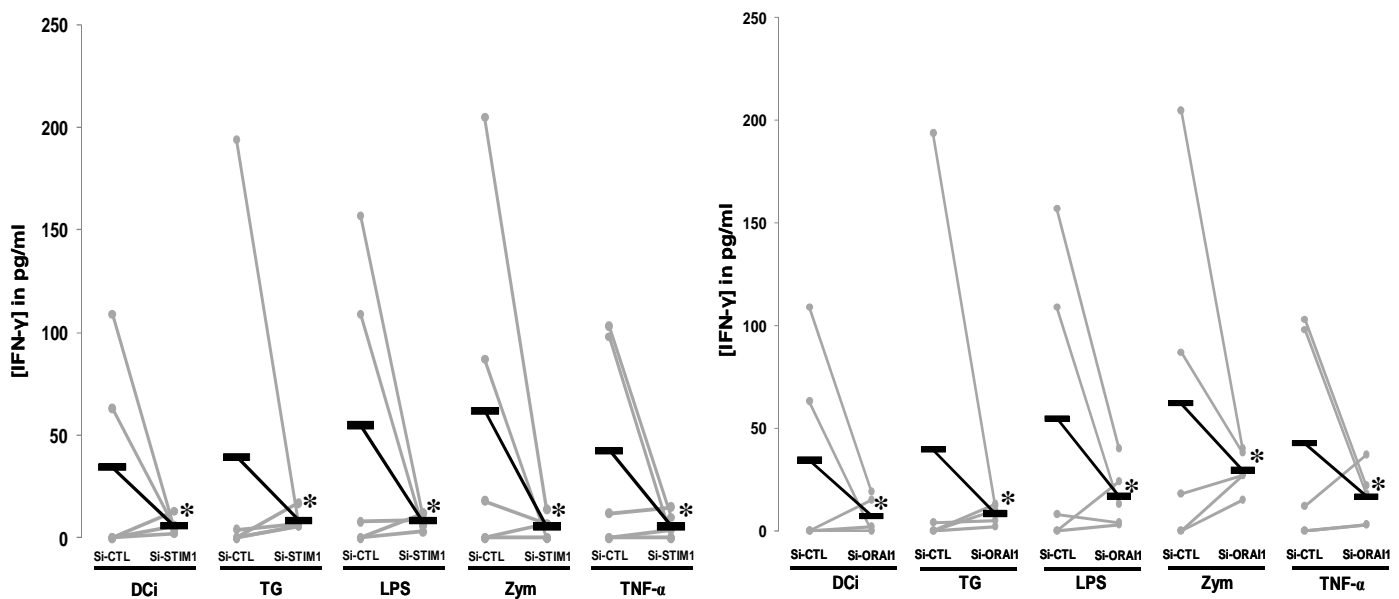


Figure 55 : Implication des protéines ORAI-1 et STIM-1 dans la sécrétion de cytokines, par le DC humaines. L'IFN- γ est isolé à partir des surnageants de culture de DC immatures traitées par différents agents de maturation (TG à 750 nM, LPS à 50 ng/mL, Zymosan à 25 μ g/mL et TNF- α à 20 ng/mL). Chaque point représente un donneur et la ligne noire, la moyenne de ces 5 expériences. (* $p < 0,05$)

La synthèse d'IFN- γ est inhibée par le traitement des DC par le si-STIM-1 ou par le si-ORAI-1. Ces résultats sont en corrélation avec les dosages de la figure 47, à l'exception, peut-être, de la synthèse d'IFN- γ par les DC traitées par la TG.

Les dosages de l'IL-12 et de l'IL-10 ont été réalisés mais n'apportent pas de résultats clairs dûs à leur grande hétérogénéité.

IV. DEVENIR DU CALCIUM ISSU DE L'ECC

L'ECC induit une augmentation conséquente de Ca^{2+} dans la cellule. Cette augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} va entraîner des cascades d'activation. En effet, il est connu que certains canaux potassiques sont sensibles au Ca^{2+} intracellulaire : la famille des KCa. Ces canaux sont connus pour être impliqués dans des mécanismes très spécialisés. Le canal KCa2.3 est impliqué dans les processus de migration de cellules cancéreuses (Potier, Joulin et al. 2006 ; Chantome, Girault et al. 2009) alors que le KCa3.1 est connu pour amplifier l'ECC induite par le TCR dans les lymphocytes T (Cahalan, Zhang et al. 2007). Par ailleurs, le canal KCa1.1 est, lui, impliqué dans les phénomènes de migration des macrophages (Ahluwalia, Tinker et al. 2004) ou dans la prolifération de cellules épithéliales (Roger, Potier et al. 2004). Nous allons donc réaliser le profil électrophysiologique de la cellule dendritique immature, afin d'identifier les canaux potassiques qui seraient présents à la membrane au moment de l'initiation de la maturation. Par la suite, nous verrons le rôle des canaux identifiés dans les fonctions des cellules dendritiques.

1. Profil électrophysiologique des cellules dendritiques immatures

1.1 Canaux sensibles au Calcium induisant des courants sortants

Nous avons donc utilisé la technique de « patch-clamp » pour identifier les canaux potassiques, présents sur la surface des DC immatures. Pour cela, nous avons placé des hDC immatures dans une solution physiologique saline (PSS), puis nous avons appliqué des protocoles de stimulation afin d'observer la présence de courants sortants qui pourraient être de nature potassique. Sur les figures 55A et 55B, afin de faciliter la lecture, a été représenté la moyenne des courbes « courant-potentiel ». Ces figures montrent la présence de deux types de courant sortant. Pour affirmer la nature potassique de ces courants, des solutions physiologiques enrichies en potassium ont été perfusées. Un déplacement du potentiel de membrane suite au changement du potentiel d'équilibre du potassium a pu être observé (données non montrées).

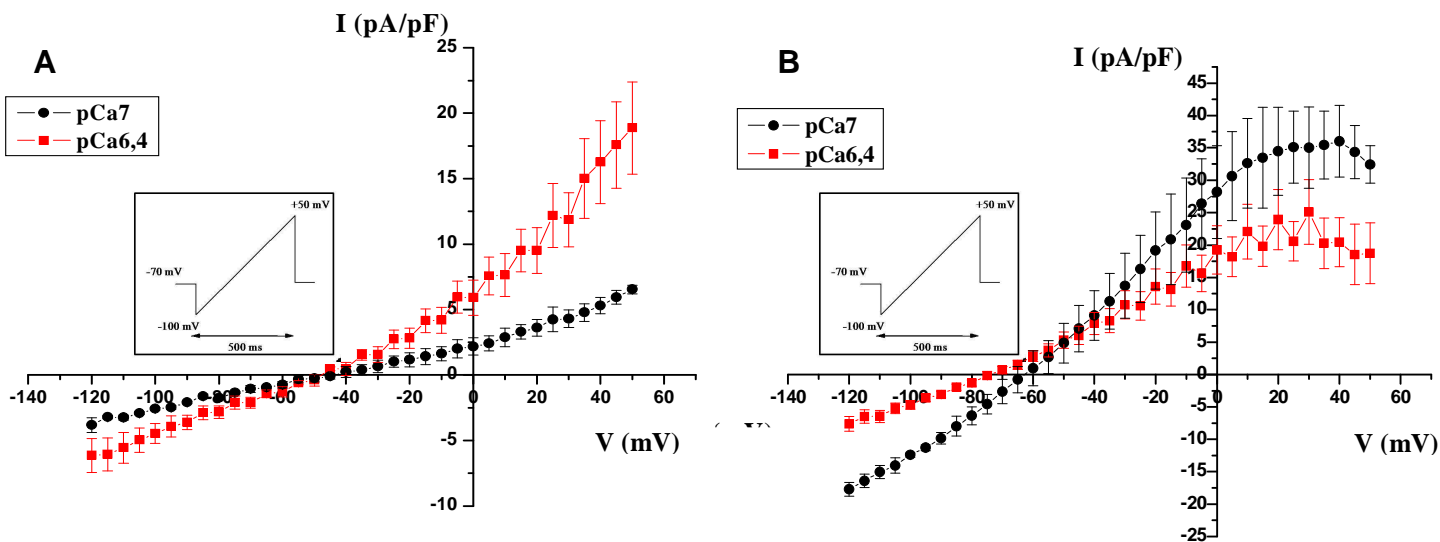


Figure 56 : Caractérisation électrophysiologique de courant potassique dans la cellule dendritique humaine immature. Un protocole de rampe de -120 à +50 mV en 500 ms (voir encadré) est appliqué sur les cellules dendritiques étudiées en configuration « cellule entière ». La sensibilité au calcium a été étudiée par l'utilisation de deux milieux intrapipette contenant 100 nM (pCa7) et 400 nM (pCa6,4) de calcium. Afin de faciliter la lecture des résultats, il a été représenté la moyenne (\pm SEM) des valeurs obtenues par le protocole de rampe pour différents potentiels imposés. (A : pCa6,4 : n = 7 / pCa7 : n = 6) (B : pCa6,4 : n = 11 / pCa7 : n = 6).

L'un de ces courants présente une rectification entrante (n = 17) et l'autre une rectification sortante (n = 13). Afin de faire le lien avec l'ECC déjà décrite au laboratoire, l'utilisation d'un milieu intrapipette (MIP) ayant une concentration de 100 ou 400 nM de calcium (respectivement pCa7 et pCa6,4) a permis de déterminer la sensibilité de ces courants au calcium. Le courant potassique à rectification sortante est plus important lorsque la concentration intracellulaire de calcium est de 400 nM (**Figure 56A**). Le potentiel de membrane de la cellule s'en trouve légèrement modifié passant de $-44,91 \pm 4,92$ mV en pCa6,4 à $-42,96 \pm 8,015$ mV en pCa7. Par contre, le courant potassique à rectification entrante est lui plus important pour une concentration intracellulaire de calcium plus faible, de l'ordre de 100 nM (Figure 3A). Le potentiel de membrane de la cellule est là aussi légèrement modifié, passant de $-70,79 \pm 3,82$ mV en pCa6,4 à $-61,58 \pm 2,72$ mV en pCa7. L'amplitude maximale de ces deux courants se situe entre +30 mV et +50 mV. Pour le courant potassique à rectification entrante, cette amplitude maximale est de $25,09 \pm 4,96$ pA/pF à +30 mV avec un MIP pCa6,4 et de $36,02 \pm 5,52$ pA/pF à +40 mV avec un MIP pCa7 (**Figure 56B**). Pour le courant potassique à rectification sortante, cette amplitude maximale est de $18,86 \pm 3,53$ pA/pF à +50 mV avec un MIP pCa6,4 et de $6,53 \pm 0,33$ pA/pF à +50 mV avec un MIP pCa7

(Figure 56A). Ainsi, ces deux canaux potassiques ne sont pas sensibles de la même manière à la concentration intracellulaire de calcium.

1.2 Caractérisation des canaux potassiques présents sur les DC humaines

L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques des canaux potassiques sensibles au calcium nous permettra de déterminer la nature des canaux ioniques responsables de ces courants. Les allures de courbes observées précédemment ont permis de suggérer la présence de canaux potassiques sensibles au calcium à grande conductance et à conductance intermédiaire, que l'on nomme respectivement BKCa et SK4 (ou IKCa3.1). Pour vérifier la présence de tels canaux, nous avons donc utilisé les inhibiteurs spécifiques de ces canaux qui sont le TRAM-34 et l'Ibériotoxine (IbTx).

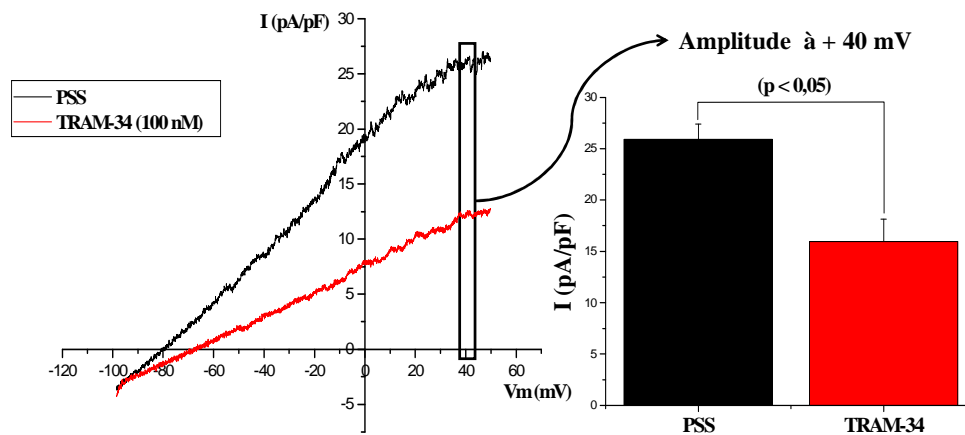


Figure 57 : Identification du canal KCa3.1 dans les DC humaines. Caractérisation pharmacologique du courant potassique observé, rectifiant entrant par l'utilisation de TRAM-34 (100 nM). La figure présentée est représentative de 3 expériences différentes.

Nous avons observé l'effet engendré par ces inhibiteurs sur les courants observés dans la figure 55, à l'aide de la technique de « patch-clamp ». Nous pouvons voir que le TRAM-34 à la concentration de 100 nM (Figure 57) inhibe de manière importante le courant potassique à rectification entrante faisant passer l'amplitude maximale du courant à +40 mV de 26,03 pA/pF à 12,13 pA/pF. Cela suggère la présence du canal KCa3.1 à la surface des cellules dendritiques immatures.

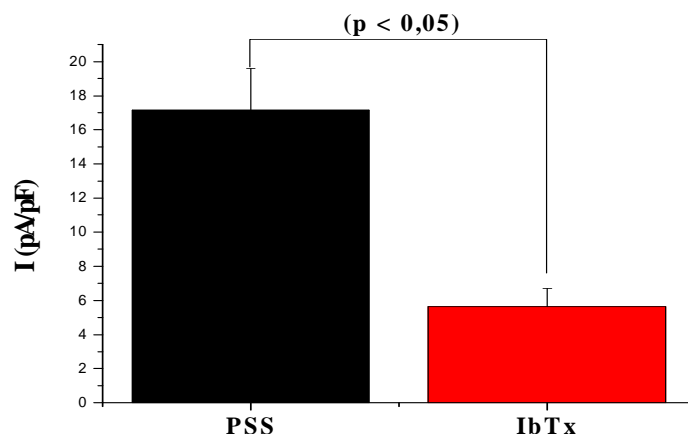


Figure 58 : Identification du canal KCa1.1 dans les DC humaines. Caractérisation pharmacologique du courant potassique observé, rectifiant sortant par l'utilisation de IbTx (100 nM). La figure représente l'amplitude du courant à +40 mV. (N=7)

L'IbTx a été appliqué sur le courant potassique à rectification sortante (**Figure 58**). Là aussi, une forte inhibition du courant peut être observée, l'amplitude maximale du courant à +40 mV passant de 17,19 pA/pF à 5,89 pA/pF. Cela nous suggère la présence du canal KCa1.1.

1.3 Caractérisation moléculaire des canaux potassiques KCa1.1 et KCa3.1

Des expériences de RT-PCR ont permis de révéler la présence de l'ARNmessenger codant pour le canal KCa3.1 dans des cellules dendritiques cultivées en présence ou non de différents agents de maturation (**Figure 59**).

Pour le canal KCa3.1, des expériences en microscopie à épifluorescence ont révélé la présence de ce canal à la surface de la cellule dendritique immature et maturée en présence de LPS pendant 18h. Des expériences similaires sont réalisées pour le canal KCa1.1. Ainsi, nous pouvons conclure à la présence physique du canal potassique KCa3.1 et du KCa1.1 à la surface de la cellule dendritique immature et mature.

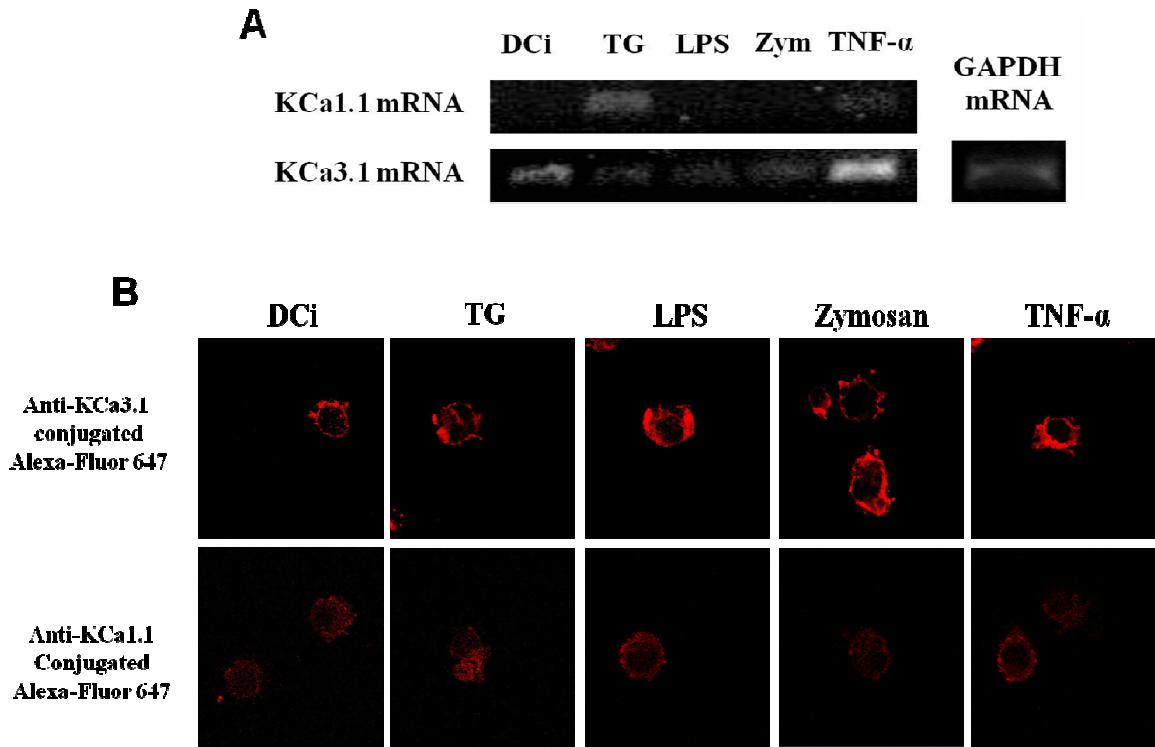


Figure 59 : Mise en évidence des canaux KCa1.1 et KCa3.1 en RT-PCR et épifluorescence.

2. Impact des inhibiteurs des canaux potassiques sur le phénotype de maturation

Afin de déterminer le rôle de ces canaux dans la maturation des DC humaines, les inhibiteurs spécifiques TRAM-34 et IbTx ont été appliqués pendant 18h sur des DC immatures en présence ou non de LPS. Comme précédemment, les marqueurs de maturation CD25 et CD83 ont été étudiés en cytométrie en flux.

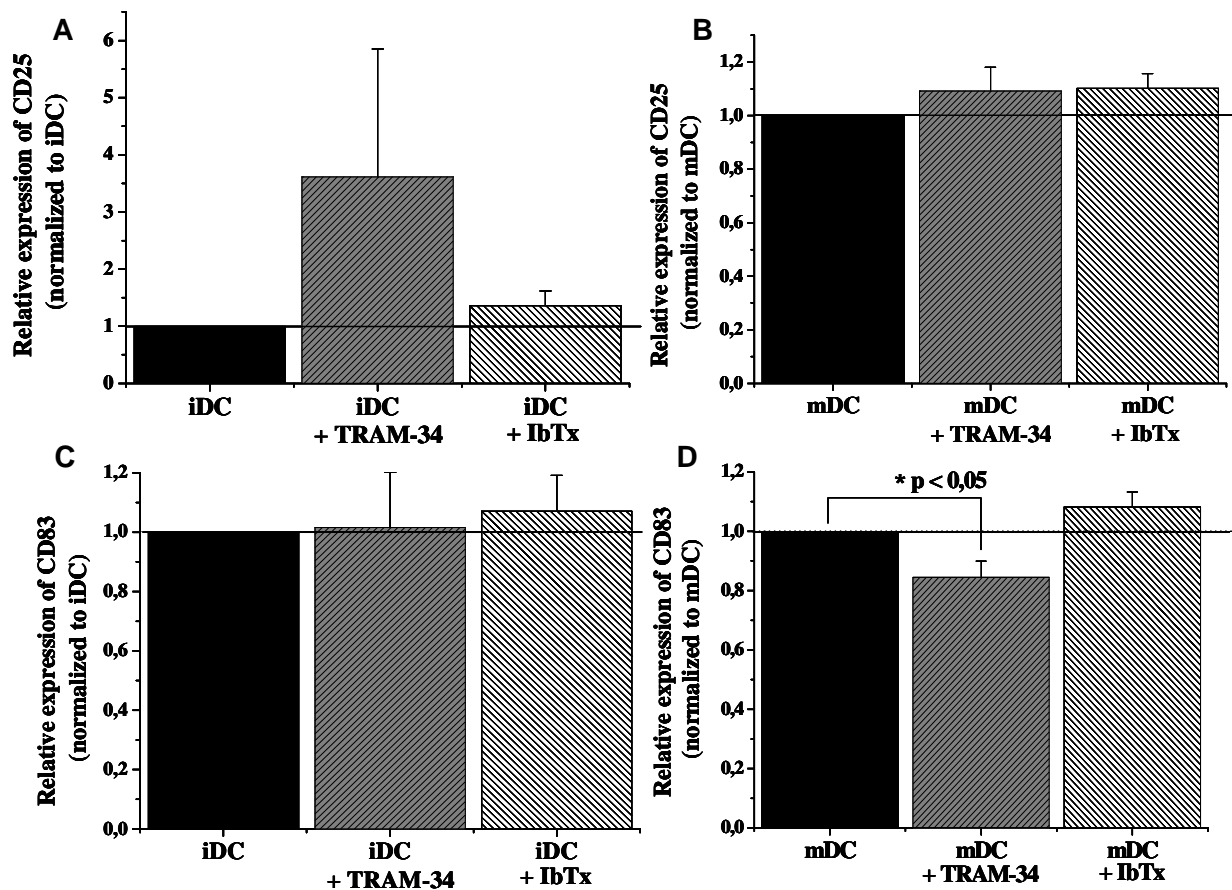


Figure 60 : Impact du TRAM-34 et de l'IbTx sur les marqueurs de maturation CD25 et CD83 des hDC. Les cellules sont cultivées 18h sans agent maturant (A et B) en présence d'IbTx (100 nM) (A) ou de TRAM-34 (100 nM) (B), en présence de LPS (50 ng/mL) (C et D) et/ ou d'IbTx (100 nM) (C) ou de TRAM-34 (100 nM) (D). L'expression des marqueurs de surface CD83 et CD25 est analysé par cytométrie en flux.

Nous avons observé tout d'abord que l'IbTx n'a aucun effet significatif sur ces deux marqueurs que la cellule soit devenue mature ou non (**Figure 60A et 60C**). Le TRAM-34 lui semble avoir un effet significatif ou proche de la significativité sur l'expression de ces marqueurs sur les DC immatures (**Figure 60B**). Le TRAM-34 augmente le pourcentage de DC positives pour ces deux marqueurs, passant ainsi pour le CD25 de 2,44 % à 5,4 % en présence de TRAM-34, et pour le CD83 de 17,65 % à 22,8 % lors de l'application de TRAM-34. Un effet négatif significatif du TRAM-34 sur l'expression du CD83 est observé lors de la maturation de la hDC (**Figure 60D**) (86,57 % pour les DC maturées par le LPS à 78,07 % pour les DC maturées par le LPS en présence de TRAM34). Au final, les marqueurs de maturation CD25 et CD83 semblent être modulé par le canal KCa3.1.

3. Impact des inhibiteurs des canaux potassiques sur l'expression des marqueurs de migration: CCR5 et CCR7

La cellule dendritique possède la capacité de migrer en réponse à la présence de chimiokines attractantes. Ainsi, nous avons voulu vérifier l'impact de ces canaux dans la modulation des marqueurs de migration CCR5 et CCR7. L'application du TRAM-34 et de l'IbTx a été réalisée pendant 18h, en présence ou non de l'agent de maturation, le LPS.

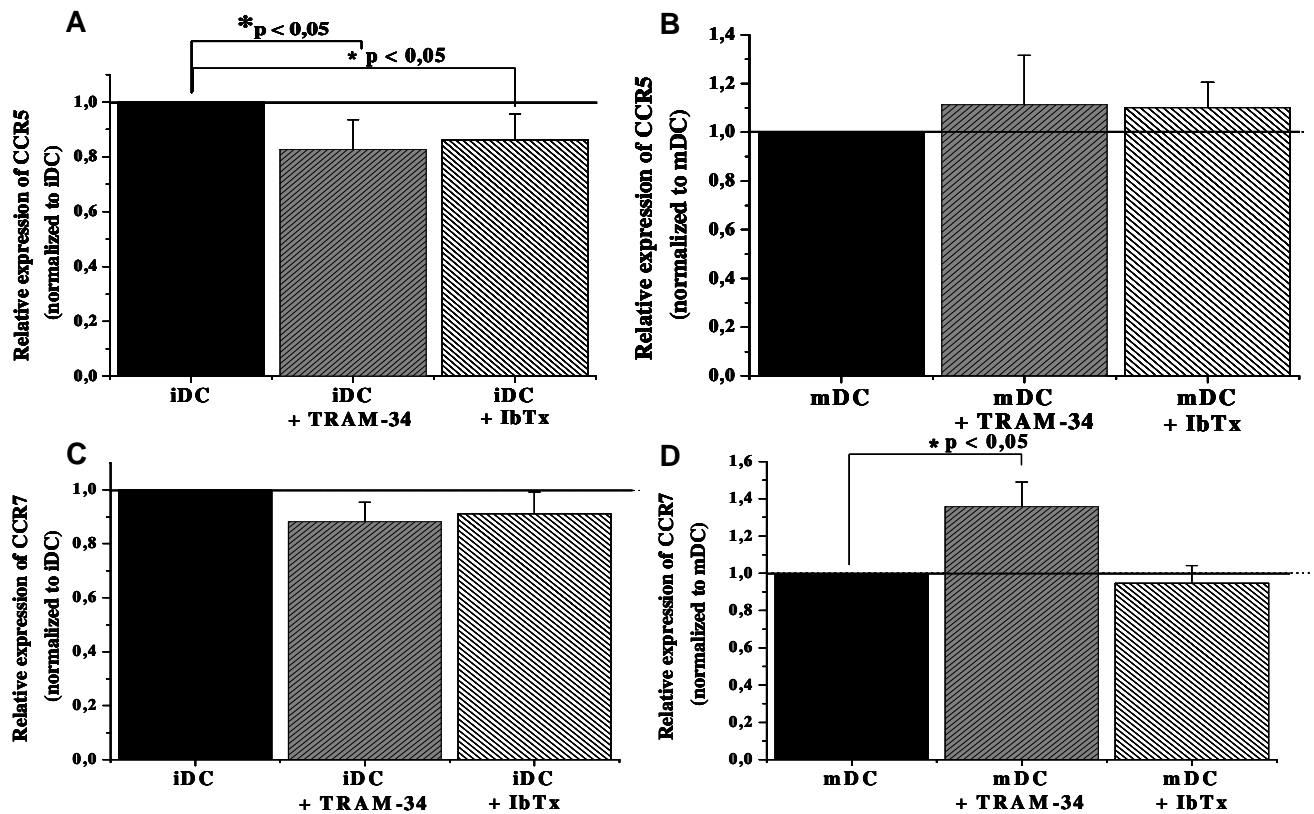


Figure 61 : Impact du TRAM-34 et de l'IbTx sur les marqueurs de migration CCR5 et CCR7 des cellules dendritiques immatures et matures en présence de LPS pendant 18 hrs. Les cellules dendritiques immatures sont cultivées 18h (A) sans agent maturant en présence de TRAM-34 (100 nM) ou d'IbTx (100 nM), (B) en présence de LPS (50 ng/mL) et/ ou de TRAM-34 (100 nM) ou d'IbTx (100 nM). L'expression des marqueurs de surface CCR5 et CCR7 est analysé par cytométrie en flux. Les barres représentent la moyenne du pourcentage normalisés de cellules dendritiques possédant le marqueur \pm SEM (Condition TRAM-34 : n = 4) (Condition IbTx : n = 8).

Le TRAM-34 diminue significativement l'expression du marqueur CCR5 sur les cellules dendritiques immatures (**Figure 61A**) passant d'un pourcentage de DC positives pour le CCR5 en condition DCi de 46,02 % à 32,9 %. Cet inhibiteur a également tendance à

augmenter l'expression du marqueur CCR7 des cellules dendritiques matures (**Figure 61D**) passant d'un pourcentage de DC positives pour le CCR7 en condition DC-LPS de 22,9 % à 31,9 %.

L'IbTx inhibe de façon significative l'expression du CCR5 sur les cellules dendritiques immatures (**Figure 61A**), le pourcentage de DC positives pour le CCR5 passant de 33,05 % à 25,95 %. Aucun effet significatif de l'IbTx n'a été observé sur le marqueur de migration des cellules dendritiques matures (**Figure 61C**).

Enfin, aucun effet significatif de l'IbTx et du TRAM-34 n'a été observé sur le marqueur de migration CCR7 des cellules dendritiques immatures (**Figure 61D**) et sur le marqueur CCR5 des cellules dendritiques matures (**Figure 61C**).

4. Impact des inhibiteurs des canaux potassiques sur la migration des DC humaines

Pour compléter l'étude précédente réalisée en cytométrie en flux, des expériences de migration au travers une membrane de polycarbonate ont été réalisées. Nous avons vérifié la capacité de migration des cellules dendritiques immatures et matures respectivement à la présence d'un gradient des chimiokines CCL5 et CCL19. L'utilisation du TRAM-34 et de l'IbTx permet de déterminer l'impact de ces canaux sur la migration des DC humaines. L'application du TRAM-34 pendant 18h semble diminuer la capacité de migration des DC immatures (**Figure 62A**), le pourcentage de DC immatures capable de migrer en réponse à la présence de CCL5 passant de $20,8 \pm 9,4$ % à 14 ± 6 % lors de l'application de cet inhibiteur. A l'inverse, cet inhibiteur augmente la capacité de migration des DC matures (**Figure 62A**) (de $27,84 \pm 6,6$ % pour les DC maturées avec le LPS à $39,52 \pm 10,18$ % pour les DC maturées avec le LPS en présence de TRAM-34).

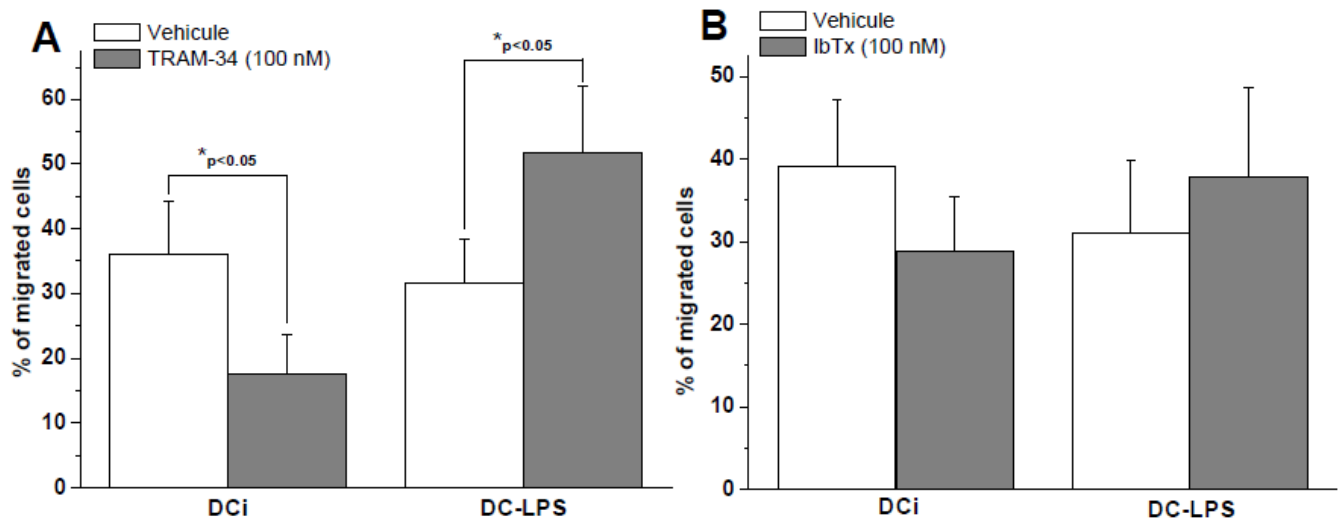


Figure 62 : Impact du TRAM-34 et de l'IbTx sur la capacité de migration des cellules dendritiques humaines. Les hDC sont cultivées durant 18h en présence ou absence de LPS (50 ng/mL) et de TRAM-34 (100 nM) ou d'IbTx (100 nM). La capacité de migration des cellules dendritiques immatures est étudiée par l'utilisation d'un milieu attractant contenant du CCL5 (50 ng/mL). La capacité de migration des cellules dendritiques matures est étudiée par l'utilisation d'un milieu attractant contenant du CCL19 (500 ng/mL). Les barres représentent la moyenne du pourcentage (\pm SEM) de cellules dendritiques ayant migrés. (Condition DCi / DC-LPS : n = 11) (Condition TRAM-34 : n = 8) (*p<0,05)

En remplaçant le TRAM-34 par l'IbTx, nous remarquons que cet inhibiteur semble également diminuer la capacité de migration des DC matures mais n'aurait pas d'effet sur celle des cellules immatures (**Figure 62B**).

V. PARTICIPATION A DES TRAVAUX SUPPLEMENTAIRES

1. L'activation des lymphocytes T CD8⁺ allogéniques cytotoxiques, par les cellules dendritiques humaines est sous la dépendance de la synthèse d'IFN- γ , par ces mêmes cellules dendritiques

Situation :

Les cellules T cytotoxiques sont un frein significatif à l'établissement et au maintien à long terme d'une allogreffe (Csencsits and Bishop 2003; Le Moine and Goldman 2003). En effet, de nombreuses études ont montré que les cellules CD8⁺ responsables du rejet étaient résistantes aux stratégies immunothérapeutiques (Newell, He et al. 1999; Trambley, Bingaman et al. 1999; Bumgardner, Gao et al. 2000; Guo, Meng et al. 2001; Wang, Gao et al. 2003). Ainsi, trouver de nouvelles stratégies pour contrôler l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ pourrait avoir d'importantes implications en transplantation.

Les signaux requis pour le développement et la fonction des cellules T CD8⁺ ne sont pas complètement décrits mais il existe 2 voies distinctes pour générer une réponse T cytotoxique à partir de LT CD8⁺ naïfs. Il a été montré que les LT CD4⁺ auxiliaires étaient essentiels pour le développement des lymphocytes T cytotoxiques (Cardin, Brooks et al. 1996; von Herrath, Yokoyama et al. 1996; Stohlman, Bergmann et al. 1998; Zajac, Blattman et al. 1998; Flano, Woodland et al. 1999; Wild, Grusby et al. 1999) mais la présence du "help" n'est pas indispensable et peut-être remplacée par d'autres signaux (Andreasen, Christensen et al. 2000; Larsson, Messmer et al. 2000; Santodonato, D'Agostino et al. 2003; Shedlock, Whitmire et al. 2003). De plus, en transplantation, certaines études ont mis en évidence des rejets de greffe induits par les LT CD8⁺ indépendamment des cellules T CD4⁺ (Haskova, Usiu et al. 2000; Vu, Amanullah et al. 2004; Habiro, Shimmura et al. 2005; Jones, Carvalho-Gaspar et al. 2006; Gelman, Okazaki et al. 2008).

Les cellules dendritiques (DC) sont les principales cellules professionnelles présentatrices d'antigène impliquées dans l'initiation des réponses T CD8 (Inaba and Steinman 1987; Kast, Van Twuyver et al. 1988; Condon, Watkins et al. 1996; Banchereau, Briere et al. 2000). Au niveau des tissus périphériques, le contact des DC avec des médiateurs

inflammatoires (TNF- α) ou des produits microbiens (LPS) entraîne leur maturation et leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires où les DC sont capables d'activer efficacement les LT (Steinman 1991; Banchereau and Steinman 1998). Cependant, certaines DC peuvent également down-réguler les réponses lymphocytaires T (Roncarolo, Levings et al. 2001) et certains agents peuvent être utilisés pour induire des DC tolérogènes (Morelli and Thomson 2007). Parmi ces agents, l'acide mycophénolique (MPA), métabolite actif du mycophénolate mofétil couramment utilisé en transplantation et dans les maladies autoimmunes (Mele and Halloran 2000; Adu, Cross et al. 2001) inhibe l'inosine 5'-monophosphate déhydrogénase (IMPDH) impliquée dans la synthèse *de novo* des nucléotides guanosine.

Objectifs et résumé des résultats :

Au laboratoire, nous avons précédemment démontré que les DC traitées avec du MPA (DC-MPA) avaient une faible capacité allostimulatrice des cellules CD4⁺ (Lagaraine, Hoarau et al. 2005). Toutefois, leur capacité à activer des cellules T CD8⁺ cytotoxiques n'a jamais été reportée chez l'homme. Etant donné que les DC humaines peuvent activer la fonction cytotoxique des cellules T CD8⁺ indépendamment des cellules T CD4⁺ « helper » (Young and Steinman 1990; Lunsford, Horne et al. 2006), nous avons voulu savoir comment le MPA pouvait affecter la capacité des DC à induire une différenciation des cellules T CD8⁺ allogéniques en lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques effecteurs, et cela en l'absence de lymphocytes T CD4⁺.

Pour réaliser cette étude, les cellules T CD8⁺ ont été purifiées à partir du sang périphérique et ont été mises en coculture avec des DC traitées au MPA provenant d'un autre donneur afin de mimer *in vitro* une situation de greffe entre le donneur et le receveur du greffon. Nous avons ensuite analysé d'un point de vue de leur phénotype, de leur capacité à proliférer et de leur fonctionnalité (fonction cytotoxique et profil de sécrétion des cytokines) les lymphocytes T CD8⁺. L'activation de cellules T CD8⁺ mémoires alloréactives apparaît comme étant un obstacle majeur pour l'induction d'une tolérance (Akbar, Amlot et al. 1990; Csencsits and Bishop 2003; Le Moine and Goldman 2003; Yang, Brook et al. 2007). De plus, la fréquence élevée des cellules T mémoires chez l'adulte peut être l'une des raisons pour lesquelles les stratégies d'induction de tolérance ont échoué chez les primates (Adams, Williams et al. 2003). C'est pourquoi, il est primordial d'étudier également les effets des DC-

MPA sur le phénotype et la fonctionnalité des cellules T CD8⁺ naïves (CD45RA⁺) et des cellules T CD8⁺ mémoires (CD45RO⁺).

Les résultats obtenus mettent en évidence que les cellules dendritiques traitées avec du MPA sont incapables d'activer efficacement les lymphocytes T CD8⁺ naïfs et mémoires. Cette faible activation entraîne une diminution de la fonction cytotoxique des CD8⁺ caractérisée par une baisse de la lyse des cellules cibles ainsi que par une diminution d'expression des différentes protéines associées à la cytotoxicité comme la perforine et les granzymes. Nous démontrons également que les DC traitées au MPA induisent des cellules T CD8⁺ anergiques qui sécrètent des quantités importantes d'IL-4, IL-5, IL-10 et TGF-β. Enfin, la diminution de synthèse d'IFN-γ dans les DC après traitement au MPA joue un rôle important dans l'induction de l'hyporéponse des LT CD8⁺.

Ainsi, ces résultats pourraient être une nouvelle approche pour moduler l'allo-réponse cytotoxique des LT CD8⁺ afin de promouvoir la tolérance d'allogreffe.

Article publié dans « Blood » cf Annexe 2

2. Mise au point de la technique d'ARN interférence sur les cellules dendritiques humaines

L'une des techniques majeures pour inhiber l'expression de protéines est la technique d'ARN interférentiels (**Figure 63**). Cette technique est très peu utilisée, selon la littérature, sur les cellules dendritiques humaines. En effet, elle est assez répandue dans les études sur les lymphocytes T ou sur les DC murines.

Le principe consiste à transférer dans la cellule cible un ARN complémentaire (sous forme double-brin) de l'ARNm de la protéine dont l'expression doit être inhibée. Ce petit ARNm (environ une vingtaine de paires de base) va être clivé par la protéine DICER, ce qui va entraîner la libération de deux ARN simple-brin complémentaire de l'ARNm de la protéine cible. Ces deux brins d'ARN vont se lier à l'ARNm à cliver. Le clivage de cet ARNm va s'effectuer par le complexe protéique RISC. Les portions d'ARN formées vont être dégradées par le protéasome. Ainsi la protéine cible va voir son expression diminuée.

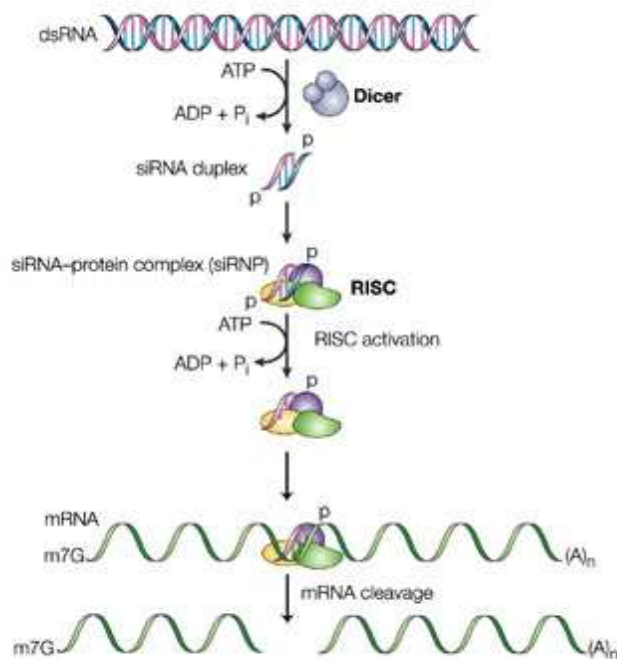


Figure 63 : Schéma simplifié de la technique d'ARN interférentiels

Lors de la mise au point de cette technique, nous avons établi des paramètres optimums de transfection (durée de la transfection, concentration de siRNA) nous permettant d'obtenir la plus grande efficacité de transfection. Cette technique présente quelques limites. Les DC humaines, ayant été en contact avec la lipofectamine, ne répondent plus de façon physiologique. En effet, les expériences de type ELISA, de migration ou d'activation lymphocytaire sont perturbées par le remodelage membranaire induit par cet agent lipofectant, la lipofectamine.

3. Impact des immunosuppresseurs sur la physiologie calcique des cellules dendritiques humaines : le MPA (acide mycophénolique)

L'acide mycophénolique, ou MPA, est un immunosuppresseur couramment utilisé en clinique humaine. C'est un inhibiteur de l'IMPDH, une enzyme de synthèse des dérivés de guanine. Cet immunosuppresseur a un effet direct sur les DC humaines (Rae, Cooper et al. 1991; Lagaraine, Hoarau et al. 2005; Lagaraine, Lemoine et al. 2008). Nous avons donc étudié son effet sur l'homéostasie calcique durant la maturation par le LPS.

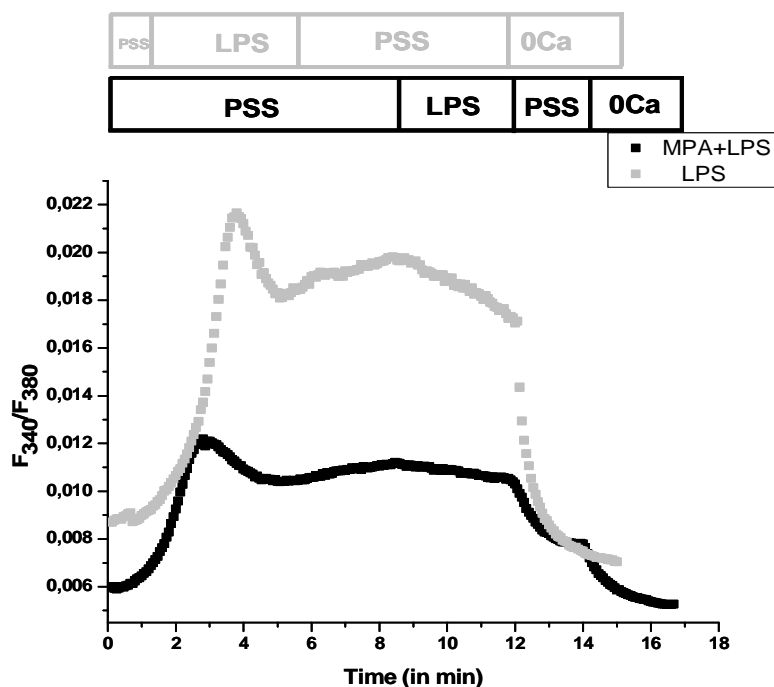


Figure 64 : Effet du MPA sur la concentration intracellulaire en Ca^{2+} .

Les DC humaines sont chargées avec du FURA-2AM, en présence de 100 μM de MPA dans le milieu. Après un rinçage avec du PSS, les cellules sont placées sur le microspectrofluorimètre pour mesurer les variations de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} . La perfusion d'une solution physiologique (PSS) induit une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} , sans stimulus de maturation. Par la suite, la perfusion d'une solution PSS, contenant 50 ng/mL de LPS, n'induit aucune augmentation de cette concentration intracellulaire de Ca^{2+} , contrairement à la figure 44A.

Discussion & Perspectives

Ce travail s'intègre dans un projet de recherche qui vise à explorer les possibilités de modulation de la réponse allogénique au travers de thérapies cellulaires en transplantation d'organe. Mon projet a pour but principal de comprendre la physiologie ionique, et plus précisément calcique, des DC humaines, dans le cadre d'une réponse allogénique. Les DC humaines jouent un rôle central dans l'activation de la réponse immunitaire innée et adaptative. Ce processus nécessite une activation, une maturation et une migration de ces cellules vers le site inflammatoire ou les organes lymphoïdes secondaires. Dans la première partie de cette étude, nous avons montré que le calcium est un élément indispensable à la maturation des DC humaines. Par conséquent, un contexte extracellulaire pauvre en Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire modifierait la réponse aux stimuli de maturation.

Dans un second temps, nous avons démontré le rôle du Ca^{2+} dans les fonctions de la DC humaine, comme la synthèse de cytokines, l'activation des cellules lymphocytaires T (données non montrées) et indirectement, la migration. En effet, les fonctions de la DC humaine sont sous le contrôle du complexe ORAI / STIM. Ce complexe fait partie du mécanisme plus global, d'entrée capacitive de Ca^{2+} ou SOCE. Par ailleurs, une fois ce mécanisme mis en jeu, l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire va activer certains canaux potassiques sensibles à cette concentration intracellulaire en Ca^{2+} . Ces canaux (KCa1.1 et KCa3.1) vont contrôler les phénomènes de migration de la DC humaine.

En conclusion, la DC humaine est sous la dépendance de son environnement calcique, pour pouvoir jouer son rôle de médiateur de l'initiation de la réponse immunitaire.

1. Le Calcium est un messager de la maturation des cellules dendritiques humaines

Les résultats rapportés dans ce travail soulignent clairement l'importance du Ca^{2+} dans la maturation des DC humaines. Ils suggèrent également le rôle d'ORAI-1 et STIM-1 dans ces phénomènes de maturation. De plus, ce Ca^{2+} joue un rôle dans les événements précoces de la maturation. Nous montrons donc que les protéines ORAI-1 et STIM-1 – le canal CRAC et son activateur – sont rapidement recrutés en réponse à une stimulation par le LPS ou le TNF- α . Ce recrutement se traduit par une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} . Par ailleurs, il est connu que certains canaux ioniques sont impliqués dans les fonctions des cellules immunitaires, plus précisément, dans celles des cellules dendritiques. En effet, Zsiros *et al.* (2010) suggèrent l'implication de deux familles de canaux ioniques dans les fonctions

des DC humaines : une dans la migration ($\text{Na}_v1.7$) et une dans la sécrétion de cytokines ($\text{K}_v1.3$), et ceci en fonction de leurs statuts de différenciation (Zsiros, Kis-Toth et al. 2009). Mais, leurs résultats montrent que le fait que le Ca^{2+} ne joue aucun rôle dans la physiologie des DC humaines. Dans notre étude, nous montrons clairement, pour la première fois, que les agents de maturation, comme les agonistes des TLR (LPS et Zymosan) ou les cytokines inflammatoires ($\text{TNF-}\alpha$) activent la DC humaine par l'activation du mécanisme SOCE. Ceci se traduit par une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire après stimulation du récepteur par son agoniste. Ces résultats sont confirmés par le fait que le Ca^{2+} , seul, peut faire induire un phénotype mature des DC humaines, ceci par des variations de la concentration extracellulaire en Ca^{2+} (de 0 à 5 mM). Dans le modèle murin, l'entrée majeure de Ca^{2+} se fait par un phénomène appelé CRAC (Calcium-Released Activated Calcium) (Hsu, O'Connell et al. 2001). Ces résultats confortent le fait qu'une stimulation par des agonistes de TLR ou des cytokines inflammatoires entraîne une entrée capacitive de Ca^{2+} (ECC). Cette ECC est sensible à 100 μM de 2-APB, un inhibiteur connu de ce type d'entrée calcique. Tous ces résultats sont confirmés par les expériences de si-RNA qui caractérisent les molécules impliquées dans ces phénomènes CRAC. En effet, que ce soit le si-STIM-1 ou le si-ORAI-1, l'amplitude de l'entrée calcique est diminuée de moitié. Ces résultats suggèrent que soit ce complexe ORAI-1/STIM-1 gouverne seul ce phénomène, car l'inhibition d'expression des ces protéines ne dépassent pas 60% ; soit serait accompagné par d'autres types de canaux.

De plus, cette ECC apparaît en réponse à une déplétion totale des stocks calciques intracellulaires (essentiellement provenant du RE). Les canaux ioniques responsables de cette déplétion sont des canaux de la membrane réticulaire, les IP_3R ou les membres de la famille RyR. Dans les DC murines, les protéines RyR1 sont décrites comme fonctionnelles dans ce phénomènes (Uemura, Liu et al. 2007) mais leur rôle dans la DC humaine n'est pas encore clair. Dans nos mains, le Dantrolène (un inhibiteur spécifique de RyR1) n'a aucun effet sur l'ECC induite par une stimulation de maturation (résultats non montrés). Toujours dans le modèle murin, O'Connell *et al.* (2002) montrent que ces protéines RyR (essentiellement RyR1) jouent un rôle prépondérant dans l'ECC induite par la caféine (O'Connell, Klyachko et al. 2002). Dans nos expériences, la situation semble tout à fait différente car le profil de l'ECC varie en fonction de l'agent de maturation. Ceci suggère que les canaux impliqués dans l'ECC, ou leurs mécanismes de régulation, pourraient être différent selon la voie de maturation (Cahalan, Zhang et al. 2007; Barbet, Demion et al. 2008).

Par ailleurs, la caractérisation de cette ECC est basée sur une simple étude pharmacologique utilisant le 2-APB, connu pour inhiber plusieurs canaux comme les TRPC1, 3, 4, 5 et 6 ; ou le SKF 96365, un inhibiteur potentiel des canaux TRPC 6 et 7 (Clapham *et al.*, 2005). Dans d'autres types cellulaires (cellules cancéreuses), une ECC, en réponse à la TG ou à l'IP₃, peut être inhibée par le SKF 96365, suggérant le rôle prépondérant des TRPC6 ou 7 (Pigozzi, Ducret et al. 2006). Les profils des ECC, obtenues en réponse aux différents agents de maturation, permettent la distinction de plusieurs types d'agents de maturation. En effet, deux groupes se distinguent clairement : un regroupant le LPS et le TNF- α et un second représenté par le Zymosan. Le premier regroupe les agents induisant une ECC irréversible et le second, celle réversible. Ces deux profils suggèrent que l'ECC est composée de deux composantes : une sensible au 2-APB et une non-sensible. L'ECC, induite par le LPS ou le TNF- α , comporte une composante continue, insensible au 2-APB et une transitoire ou soutenue, sensible à ce même inhibiteur. Au contraire, le Zymosan induit une ECC réversible lorsque l'on perfuse une solution de rinçage (du PSS). Cette réversibilité suggère, même si le complexe ORAI-1 / STIM-1 semble majeur, qu'il existerait plusieurs voies calciques, en réponse à la déplétion des stocks du RE, dans la DC humaine. Dans nos travaux, les cinétiques de l'augmentation intracellulaire de Ca²⁺, induite par le LPS ou le TNF- α , sont plus lentes que celle induite par le Zymosan. Par conséquent, l'ECC, induite soit par le LPS soit par le TNF- α , semble faire intervenir des canaux différents, au niveau de la membrane plasmique, de celle induite par le Zymosan. Cependant, ces canaux sont vraisemblablement différents mais de même nature : ils appartiennent tous à la grande famille des SOCs (Store-Operated Channels). C'est pourquoi, une analyse en « patch-clamp » serait nécessaire pour déterminer avec précision les familles impliquées dans ces mécanismes d'ECC, dans la DC humaine. En effet, de résultats préliminaires montrent l'implication des SOCs dans l'ECC des DC immatures (**Figure 47**).

De plus, il paraît important de signaler que le traitement par le 2-APB induit une augmentation du niveau basal de Ca²⁺ dans la cellule. En effet, le potentiel de membrane des DC humaines est gouverné par les conductances potassiques. De plus, le spectre d'inhibition du 2-APB étant assez large, nous observons donc une possible variation de ce potentiel de membrane. C'est pourquoi, au potentiel d'équilibre, si l'efflux de potassium est inhibé par le 2-APB au travers des canaux TRP, la membrane plasmique se trouvera dépolarisée et cette dépolarisation va induire l'activation ou la modification du courant résultant de l'activité de canaux dépendants du potentiel, comme l'échangeur NCX (Na-Ca). Cet échangeur va donc

être inhibé. Le résultat de cette dépolarisation va se traduire par une diminution de l'entrée de Na^+ et de l'extrusion de Ca^{2+} , entraînant une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} .

2. Le complexe ORAI / STIM gouverne l'ECC des DC humaines induite par les différents agents de maturation

L'élément le plus important dans notre étude est que la principale composante de l'ECC est due à ORAI-1 – le canal CRAC proprement dit – et à STIM-1 – son activateur. Des études antérieures ont montré que le complexe ORAI-1 / STIM-1 est une des principales voies d'entrée du Ca^{2+} dans la DC murine (Matzner, Zemtsova et al. 2008). Nous avons démontré que ces protéines sont exprimées dans les DC humaines traitées par les différents agents de maturation. En effet, l'ARNm de ORAI-1 ne semble pas modifié, quelque soit les conditions et ceci reste en cohérence avec le profil des ECC observées.

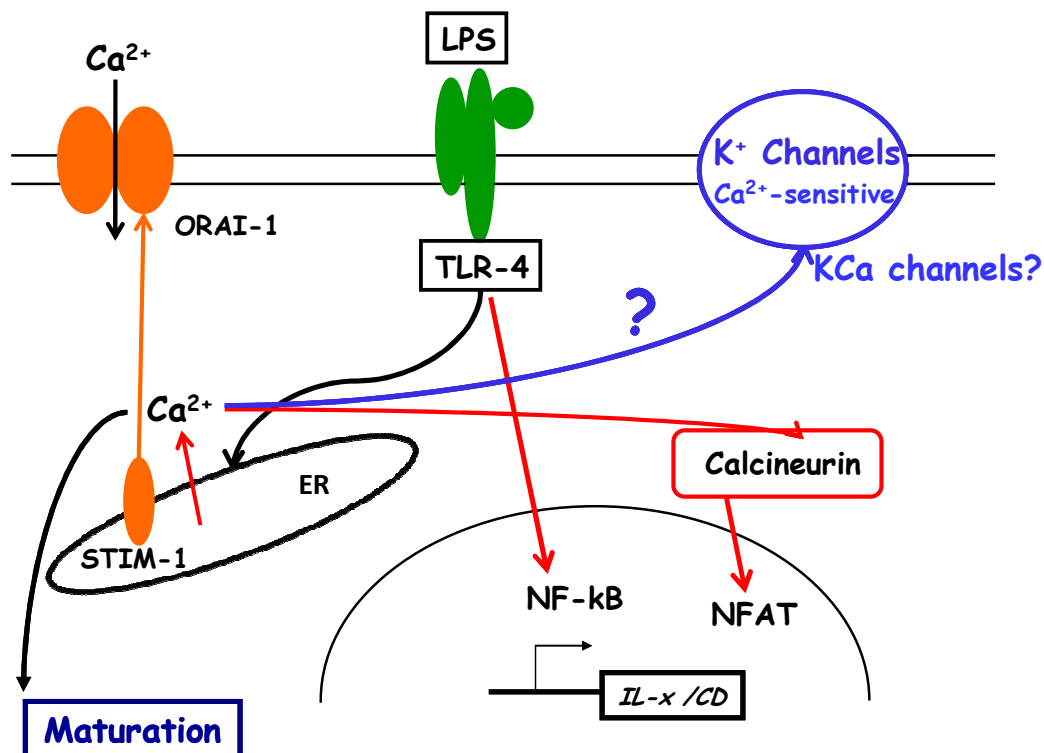


Figure 65 : Mécanisme d'activation des DC humaines par le LPS

Par ailleurs, une confirmation de l'implication de cette protéine dans l'ECC est apportée par les expériences de si-RNA. Quand les DC sont traitées par des si-RNA spécifiques d'ORAI-1 ou de STIM-1, une diminution de l'amplitude de l'ECC est observé. Par conséquent, ce résultat suggère que l'ECC observé est la résultante de l'activation de différents canaux comme les isoformes de la famille ORAI ou ceux de la famille TRPC. Motiani *et al.* (2010) ont montré qu'ORAI-3 intervenait comme un nouveau partenaire de l'entrée capacitive de Ca^{2+} dans les cellules cancéreuses (Motiani, Abdullaev et al. 2010). De plus, le marquage de la protéine ORAI-1, dans les DC humaines traitées par le Zymosan, expose des structures ressemblant à des « puncta » de protéines (**Figure 52**). En effet, le Zymosan semble être incorporé dans les DC murines ou humaines pour former des vésicules de phagocytose en réponse à un remodelage membranaire (Rogers, Slack et al. 2005; Valera, Fernandez et al. 2008). Enfin, le recrutement de ce complexe de protéines est connu pour des phénomènes cellulaires semblables dans d'autres cellules immunitaires. En effet, ces deux protéines (ORAI-1 et STIM-1) sont recrutées et migrent vers la synapse immunologique quand le lymphocyte T interagit avec la cellule présentatrice d'antigène (Lioudyno, Kozak et al. 2008).

3. Les fonctions de la DC humaine sont dépendantes du Calcium

La maturation, la synthèse de cytokines sont deux des fonctions principales de la DC humaine. En effet, une DC va recevoir un stimulus et va y répondre en exprimant des marqueurs spécifiques à sa surface et en synthétisant des cytokines pour permettre l'orientation appropriée de la réponse immunitaire.

L'entrée capacitive de Ca^{2+} (ECC), décrite dans les paragraphes précédents, est impliquée dans les fonctions de la DC humaine. En effet, un traitement au 2-APB, un inhibiteur de ce mécanisme SOCE, va entraîner une inhibition de l'expression des marqueurs de maturation (principalement le CD25 et le CD83) et celle de la production de cytokines (IL-12, IL-10 et IFN- γ). Ces résultats sont confirmés par les expériences de si-RNA pour les marqueurs de maturation et pour la sécrétion d'IFN- γ . Ainsi, il est possible d'affirmer que le Ca^{2+} est absolument nécessaire pour l'activation des DC humaines et ceci par l'intermédiaire d'une modulation du phénotype de surface et de la sécrétion de cytokines par le mécanisme SOCE. Dans le modèle murin, des ECC, de profil et nature différente, sont décrites comme

intervenant dans les fonctions des DC, en réponse soit à le TG soit à la nifedipine. Hsu *et al.* (2001) ont démontré l'implication d'une ECC, induite par la TG, dans l'apparition du phénotype mature des DC murines (Hsu, O'Connell et al. 2001).

Par ailleurs, de nombreuses voies de signalisation, associées aux TLR (récepteurs à Tyrosine Kinase) et aux GPCR (récepteurs couplés aux protéines G), ont un rôle substantif dans la régulation des fonctions de la DC humaine. Les voies de signalisation, associées au TLR-2 et au TLR-4, induisent la maturation des DC immatures et modifient le profil de sécrétion de cytokines. Elles favorisent la synthèse d'IL-12, d'IL-10 et d'IFN- γ . En effet, dans les modèles murins ou humains, l'activation du TLR-4 provoque le recrutement de petites protéines G et de ces régulateurs (RGS : regulator of G proteins signaling) (Shi, Harrison et al. 2004). Ces protéines régulatrices semblent être impliquées dans la déplétion des stocks calciques du RE, induite par l'activation de TLR ou récepteurs aux cytokines inflammatoires.

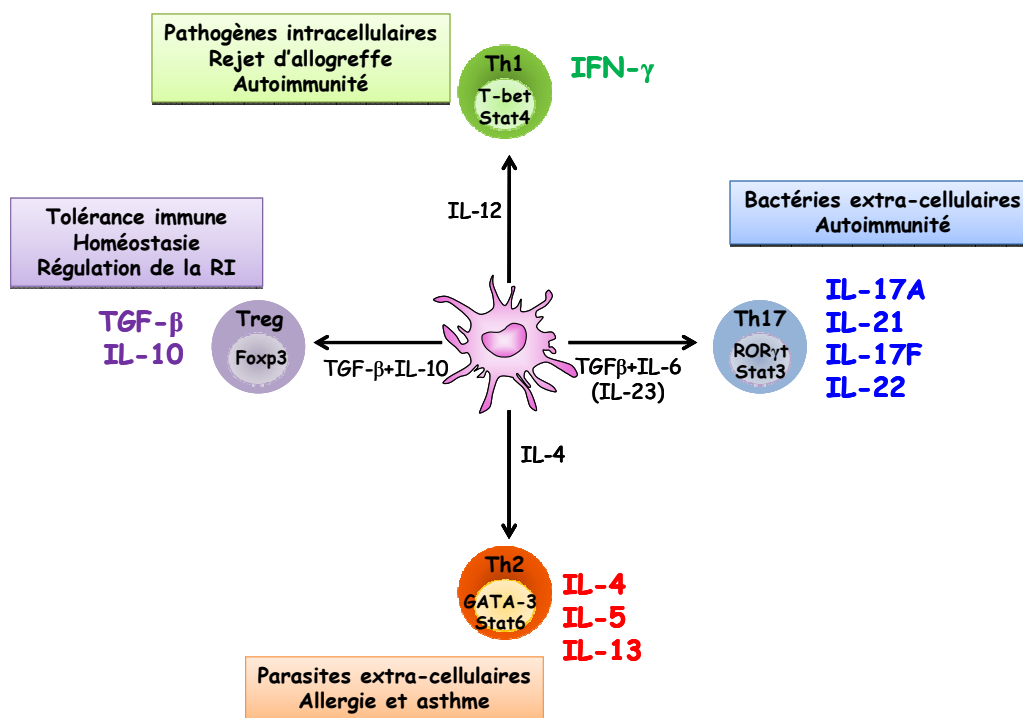


Figure 66 : Orientation lymphocytaire T D'après Alegre *et al.*, 2007

Cependant, la production de cytokines (essentiellement l'IL-12) semble également être modulée par des GPCRs. Or, dans nos travaux, la sécrétion d'IL-12 est totalement abolie par le traitement au 2-APB. Il est donc possible que des régulateurs des GPCRs, non identifiés

pour l'instant, interagissent avec les voies de signalisation induisant la sécrétion de cytokines après une stimulation par LPS ou TNF- α .

Enfin, l'activation des lymphocytes T, par les DC, se divise en plusieurs signaux. En effet, cette activation comporte trois signaux principaux. Les signaux 2 et 3 sont ceux responsables de cette orientation lymphocytaire. En effet, les protéines de co-stimulation et les cytokines sécrétées par les CPA (ici, les DC humaines) vont permettre l'adaptation de la réponse au stimulus antigénique. Nous avons vu que ces molécules de co-stimulation, et plus précisément le CD86, était sensible à la concentration extracellulaire, comme intracellulaire, en Ca²⁺. Leur expression est inhibée par le 2-APB, ce qui va entraîner une modulation de l'activation lymphocytaire T (Zheng, Manzotti et al. 2004).

De plus, l'implication de l'ECC dans la synthèse de cytokines permet, à la DC, de moduler les différentes voies d'activation des cellules T. En effet, les sécrétions des DC humaines vont jouer un rôle dans l'orientation des lymphocytes T (**Figure 66**). Des expériences préliminaires, sur l'activation lymphocytaire, ne soulignent aucune différence dans le pourcentage de cellules proliférantes mais révèlent que des lymphocytes T, activés par des DC traitées par la TG, parcourent peu de cycles de prolifération. Ces expériences sont à confirmer par une étude de cycle cellulaire.

4. Activation des canaux potassiques par le Calcium intracellulaire

L'application d'une concentration extracellulaire de K⁺ lors de la maturation des DC par le LPS a un effet inhibiteur, sur l'expression de CD83 et CD25, marqueurs de maturation (Données non montrées). Ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus dans la publication de Bracci *et al.* (2007) où une augmentation de l'expression du CD83 d'environ 15 % était observée dans des conditions similaires (Bracci, Vukcevic et al. 2007). L'effet observé par ces auteurs pourrait être un effet transitoire de la phase précoce de la maturation. La modulation des marqueurs de surface constitue la première preuve de l'impact du K⁺ sur la maturation de la DC. Cet effet permet de supposer la présence de canaux ioniques. En effet, pour un potentiel donné, le courant généré par le canal potassique sera plus faible lorsque la concentration en K⁺ extracellulaire est augmentée. Ce phénomène est lié à la diminution du

gradient électrochimique de l'ion. Ainsi, les résultats que l'on obtient sur l'expression du CD25 et du CD83 lors d'une maturation en présence d'une forte concentration extracellulaire en K^+ semblent indiquer que le courant généré par des canaux potassiques module l'expression de ces deux marqueurs de maturation à la surface de la DC.

Dans un second temps, nous avons identifié des canaux potassiques qui pourraient avoir un impact sur la maturation de la DC. Ces canaux potassiques sont sensibles au Ca^{2+} intracellulaire, issu de l'ECC. Grâce à la technique de « patch-clamp », les canaux de cette famille peuvent être discriminés grâce à leurs sensibilités au Ca^{2+} et l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques.

Deux types de courant potassiques ont été observés sur la DC humaine immature. Le premier est caractérisé par une rectification sortante et une activité significative pour une concentration en Ca^{2+} intracellulaire de 400 nM. Ce courant est inhibé par l'application de l'Ibériotoxine (IbTx) à 100 nM, inhibiteur spécifique du canal potassique sensible au Ca^{2+} intracellulaire, KCa1.1 (BKCa). Ce courant semble être donc le reflet de l'activité du canal KCa1.1.

Le second courant observé est un courant caractérisé par une rectification entrante. Ce courant semble avoir une activité plus importante pour une concentration en Ca^{2+} intracellulaire de 100 nM que celle observé pour une concentration de 400 nM. Cela semble supposer que le canal responsable de ce courant est plus sensible et est modulé par le Ca^{2+} intracellulaire que le canal KCa1.1. Toutefois, ce courant peut être inhibé par l'application du TRAM-34 à 100 nM, inhibiteur spécifique du canal potassique sensible au Ca^{2+} , KCa3.1 (SK4 / IKCa). Ce canal n'est pas décrit comme pouvant être inhibé par de fortes concentrations en Ca^{2+} intracellulaire. Nous pouvons supposer que la différence d'amplitude de courant observé entre les deux concentrations de Ca^{2+} intracellulaire peut être due à la présence aléatoire d'un autre canal potassique qui peut être inhibé par le Ca^{2+} intracellulaire, comme par exemple le canal KCa3.1. Ces deux canaux KCa3.1 et KCa1.1 ont été mis en évidence grâce à leurs activités. Pour le canal KCa3.1, ces résultats sont confortés par la mise en évidence de son ARNm et par marquage en épifluorescence. Ce canal semble être exprimé de la même manière sur les DC immatures et matures, indiquant qu'il n'est pas régulé par la maturation. Le même travail a été réalisé pour le canal KCa1.1. Mais ce canal serait très peu exprimé dans toutes les conditions, excepté pour le traitement au TNF- α où il serait surexprimé. La présence de ces canaux pose la question de leurs rôles éventuels sur les

fonctions de la DC. Sont-ils seulement présents pour réguler le potentiel de membrane et soutenir l'influx calcique lors de l'ECC ou ont-ils un autre rôle ?

Des canaux de cette famille ont été retrouvés comme ayant une action dans la motilité et la migration de cellules cancéreuses (Potier, Joulin et al. 2006; Chantome, Girault et al. 2009) et des éosinophiles (Saito, Sato et al. 1996). Le canal KCa3.1 a été montré comme impliqué dans la migration des macrophages mais aussi dans la prolifération de différents types cellulaires comme les lymphocytes (Toyama, Wulff et al. 2008), les cellules mésenchymateuses (Tao, Lau et al. 2008) et les mastocytes (Duffy, Cruse et al. 2008). Le canal KCa1.1 a lui été décrit comme étant principalement un canal fonctionnant en lien étroit avec des canaux calciques (Berkefeld, Sailer et al. 2006; Zhao, Zhao et al. 2007), mais certains articles indiquent son rôle dans la prolifération de cellules cancéreuses mammaires (Roger, Potier et al. 2004).

Sur les DC immatures, l'inhibition du canal KCa1.1 n'avait pas d'effet sur les marqueurs de maturation CD83 et CD25, mais a un effet négatif significatif sur l'expression du marqueur CCR5. Au contraire, aucun effet n'est retrouvé sur la capacité de migration en réponse à la chimiokine CCL5 (ligand du CCR5) des DC immatures cultivés en présence d'IbTx. Ainsi, le canal KCa1.1 ne semble pas jouer un rôle dans la migration des DC immatures, mais ne participerait pas non plus à l'établissement du phénotype de maturation. Le canal KCa3.1 a un effet régulateur sur l'expression des marqueurs de maturation CD25 et CD83. Il pourrait également avoir un rôle activateur sur la migration des DCi, puisque son inhibition diminue l'expression du CCR5 et la capacité de migration des DCi. Le canal SK4 pourrait avoir un rôle dans le maintien de la DC dans l'état immature.

Sur les DC matures, l'inhibition du canal KCa1.1 ne semble pas avoir d'effet ni sur les marqueurs de maturation, ni sur le marqueur de migration spécifique de cet état, de même que sur la capacité de migration. L'inhibition du canal KCa3.1, entraîne une légère diminution de l'expression du marqueur de maturation CD83, mais n'a aucun effet sur le CD25. La capacité de migration se trouve augmentée ainsi que l'expression du marqueur CCR7. Ainsi, on peut supposer que le canal KCa3.1 sur les DC matures aurait tendance à diminuer leurs capacités de migration et à favoriser un état moins mature.

Au final, des deux canaux potassiques sensibles au Ca^{2+} intracellulaire, le canal KCa3.1 semble présenter un rôle plus important dans les fonctions des DC. En effet, ce canal aurait une tendance à maintenir l'état immature des DC et à favoriser la migration en réponse à la chimiokine CCL5, et à l'état mature, diminuerait leurs capacités de migration pour la

chimiokine CCL19. Le canal KCa1.1 ne semble pas avoir la même importance que le canal KCa3.1 dans les fonctions de la DC humaine.

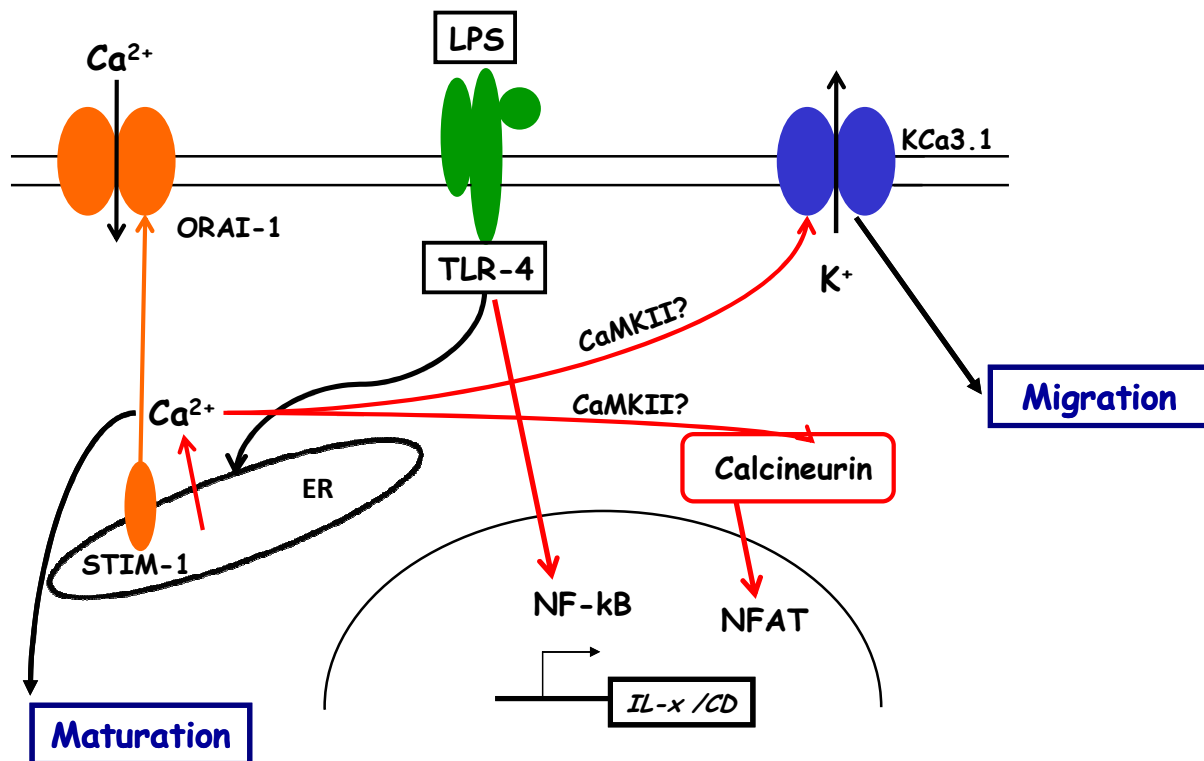


Figure 67 : Mécanisme d'activation des DC humaines par le LPS

A l'issue de ce travail, une question reste en suspend. Elle concerne la façon dont ces deux canaux peuvent co-exister sur la DC. En effet, sur 21 cellules analysées en « patch-clamp », seules 7 cellules présentent un courant engendré par le canal BKCa et 14 un courant engendré par le canal KCa3.1. Ces deux courants n'ont pas été retrouvés simultanément sur la même cellule. De plus, il a été observé que les DC présentant un courant lié à KCa3.1 avait un potentiel de membrane moyen de $-70,79 \pm 3,82$ mV alors que les DC présentant un courant lié au canal KCa1.1 avait un potentiel de membrane de $-44,91 \pm 4,92$ mV. Pour expliquer ce phénomène, on peut supposer un état de maturation différent entre les cellules. Une pseudo-maturation initiée par un facteur quelconque (protéine du sérum de veau foetal, effet mécanique, contaminant lymphocytaire,...) changerait le profil de maturation de certaines des cellules analysées. Des résultats préliminaires d'expériences de « patch-clamp » réalisés sur des cellules matures semblent indiquer la présence du canal KCa1.1. On peut donc supposer que le canal KCa3.1 soit majoritairement présent sur les DC à l'état immature, participant à la stabilité de cet état et à la fonction de migration de ces cellules. Lors de la maturation, il se

produirait un changement dans le type de canaux ioniques exprimé à la surface. Le canal KCa1.1 serait le plus exprimé que le canal KCa3.1. Ce genre de phénomène a déjà été décrit dans la DC humaine, pour les canaux Na_v et K_v (Zsiros, Kis-Toth et al. 2009). Une autre hypothèse serait que le canal KCa3.1 serait capable d'inhiber le canal BKCa. Dans les cellules acineuses des glandes salivaires de souris, la partie N-terminale du canal KCa3.1 serait capable de bloquer le pore du canal KCa1.1 (Thompson and Begenisich 2009).

5. Rôle du mécanisme SOCE dans l'immunodéficience

Nos résultats montrent le rôle du complexe ORAI / STIM dans les fonctions de la DC humaine. En effet, ces protéines interviennent dans l'ECC des DC humaines, induite par les agonistes de TLR ou les cytokines inflammatoires. Par conséquent, elles jouent un impact sur la physiologie immunitaire totale, au travers des homéostasies ioniques de la DC humaine comme dans le lymphocyte T. Il est à noter que ce mécanisme SOCE est particulièrement affecté dans les cellules T issues de patients souffrants d'un syndrome d'immunodéficience sévère combinée (SCID). Dans leur cas, la déplétion des stocks calciques, induite par la TG, ne provoque aucune entrée de Ca²⁺, même si la concentration du milieu extracellulaire est voisine de 2 mM. Ces patients ne présentent aucune mutation d'ORAI-1 mais l'expression de l'ARNm et de la protéine STIM-1 est quasiment indétectable dans leurs cellules T (Picard, McCarl et al. 2009). Par ailleurs, le phénotype clinique de ces patients est très proche de patients présentant une mutation de la protéine ORAI-1. Tout ceci suggère que ces deux protéines agissent dans une même voie d'activation de la cellule T (Feske 2009). Par conséquent, des études sur des DC issues de patients ayant une mutation pour l'une ou l'autre de ces protéines seraient intéressantes à mener. La limite se présentant est le fait que ces patients ont une durée de vie assez courte (environ une quinzaine d'années). C'est pourquoi, des études sur des souris KO pour ces protéines seraient, dans un premier temps, plus envisageables, même si, comme nous l'avons vu auparavant, la physiologie calcique des DC murines semble tout à fait différente de celle des DC humaines.

Enfin, l'étude de cellules de la lignée myéloïde, issues de patients mutées pour l'un ou l'autre des protéines d'intérêt, serait un atout pour comprendre avec certitude le rôle de ces protéines, responsables de ce mécanisme SOCE, dans les fonctions cellulaires de l'immunité. Ces études devraient être confirmées par des expériences sur des souris KO mais ceci est assez difficile à cause de la létalité importante induite par l'extinction de ces protéines.

6. L'homéostasie calcique peut être gérée par des canaux calciques différents des SOC

L'homéostasie calcique des cellules non-excitables peut être régulée par d'autres types de canaux : des canaux connus pour être sensibles au potentiel de membrane. Ces canaux dépendants du potentiel (les Ca_v) sont retrouvés dans les cellules non-excitables. En effet, les canaux ioniques, plus précisément les calciques, peuvent être des cibles privilégiées pour des traitements. Nous verrons donc des exemples de traitements ciblant des canaux ioniques : le rôle des Ca_v dans l'asthme expérimental, le rôle immunosuppresseur du diltiazem dans la greffe d'organe et le développement d'inhibiteurs spécifiques de canaux dans des maladies auto-immunes comme la sclérose en plaques.

6.1 Le rôle des canaux Ca_v dans la physiologie des lymphocytes T

Cabral *et al.* (2010) ont montré le rôle des canaux Ca_v1 dans l'asthme expérimental chez la souris (Cabral, Paulet et al. 2010). Ces canaux sont exprimés par les lymphocytes Th2. Ils ne sont pas activables par la dépolarisation de la membrane. En effet, aucun courant calcique dépendant du voltage n'a été détecté dans les lymphocytes Th2 stimulés par les KCl, qui dépolarise la membrane. Ceci laisse penser que l'activation des canaux Ca_v1 dans les lymphocytes Th2 serait régulée d'une autre façon. L'absence de régulation par le voltage peut être due soit à une structure différente, soit à la présence de kinases associées au canal ou soit à la conformation du canal qui l'empêche d'être sensible au voltage. Les auteurs n'ont pas retrouvé de différence notable dans la structure de ces canaux. Il est donc très vraisemblable que l'activité de ces canaux soit modulée par des protéines kinases. En effet, les protéines kinase G et C semblent toutes les deux importantes pour l'activation des canaux Ca_v1 dans les lymphocytes Th2. L'inhibition de l'une ou l'autre de ces kinases abolit le signal calcique dépendant des canaux Ca_v1 .

Comme nous l'avons précédemment, les DC humaines expriment des canaux Ca_v1 récepteurs aux dihydropyridines. L'augmentation de concentration du calcium intracellulaire est nécessaire à l'endocytose et à la production d'IL-12, fonctions essentielles aux DC. Cette augmentation de concentration de Ca^{2+} est due en partie à la présence des canaux calciques sensibles aux dihydropyridines. De plus, l'endocytose des corps apoptotiques, ainsi que la production d'IL-12, sont inhibées par des antagonistes de ces canaux. L'utilisation d'une

dihydropyridine fluorescente montre sa fixation à la membrane des DC. Enfin, la sous-unité $\beta 1$ est présente dans des lysats de DC. Dans cette étude, les auteurs ont montré que le canal Ca_v1 détecté dans les DC est indépendant du voltage (Poggi, Rubartelli et al. 1998).

C'est pourquoi, ces canaux Ca_v restent des cibles potentielles pour des études sur l'homéostasie calcique. En effet, beaucoup de canaux ioniques auraient un rôle dans la physiologie des cellules immunitaires. Mais ce rôle n'est pas toujours dit « ionique ». Les rôles dits « accessoires » ou « non-ioniques » sont de plus en plus étudiés. Prenons l'exemple du canal $Ca_v1.2$ qui aurait un rôle non-ionique dans l'asthme expérimental, chez la souris. En effet, l'extinction par siRNA de cette protéine a un effet bénéfique sur les souris « asthmatiques » (Cabral, Paulet et al. 2010).

6.2 Les effets immunosuppresseurs des inhibiteurs des canaux calciques dépendants du potentiel : les canaux Ca_v

Des études cliniques sur le rôle immunosuppresseur d'inhibiteurs des canaux Ca_v sur le rejet de greffe ont montré que le traitement de patients transplantés par le diltiazem améliore leur survie, après 12 mois de transplantation (McDonald and Russ 2002). De plus, certaines études montrent que cet inhibiteur améliorerait le taux de rejet (Wagner and Neumayer 1987). Cependant, tous ces résultats restent contradictoires. En effet, de nombreuses études rapportent que cet inhibiteur n'a aucun effet sur les différents paramètres de la transplantation (Donmez, Karaaslan et al. 1999; Ingsathit, Sumethkul et al. 2006). Le résultat significatif ou non est vraisemblablement très dépendant de la nature de la cohorte de patients utilisée. La sélection de la cohorte de patients induit donc un biais d'analyse statistique.

De plus, les effets immunosuppresseurs du diltiazem sont observés à des doses supra-thérapeutiques. C'est pourquoi, son action immunosuppressive doit être moindre lors d'un usage thérapeutique. Il est donc très difficile d'observer les conséquences de son action sur le système immunitaire *in vivo*. Les résultats de l'influence du diltiazem sur les paramètres de la greffe restent donc très conflictuels. Si une amélioration de ces paramètres est observée, il faudrait donc mettre en évidence le potentiel immunosuppresseur du diltiazem ainsi que sa dose permettant cette possible action. Une méta-analyse (Cross, Webster et al. 2009) conclut que l'administration d'un inhibiteur calcique améliore la fonction rénale post-transplantation. Mais, le mécanisme d'action de cet inhibiteur calcique reste encore hypothétique.

6.3 Les traitements de maladies auto-immunes ciblant les canaux ioniques

Rangaraju *et al.* (2009) explorent l'effet potentiel d'un inhibiteur des canaux $K_V1.3$ comme traitement contre la sclérose en plaques (Pennington, Beeton *et al.* 2009; Rangaraju, Chi *et al.* 2009). En effet, les traitements ciblant le système immunitaire sont non-spécifiques d'un type cellulaire. Dans certaines maladies auto-immunes, les lymphocytes T mémoire auto-réactifs apparaissent comme des médiateurs privilégiés de l'inflammation. Ces cellules expriment une quantité non négligeable de canaux $K_V1.3$. Des inhibiteurs de ces canaux vont inhiber le signal calcique, la production de cytokines et la prolifération de ces cellules T auto-réactives, *in vitro* ; et vont diminuer la migration de ces mêmes cellules *in vivo*. Enfin, des expériences, *in vivo*, montrent une amélioration de l'état des animaux, dans des modèles de sclérose en plaque, d'arthrite rhumatoïde, de diabète de type I et de dermatoses multiples. En conclusion, des inhibiteurs de canaux ioniques, ici les canaux $K_V1.3$, semblent être de très bon candidats dans le cadre de certains traitements.

Les canaux ioniques semblent être une cible intéressante pour le développement de nouveaux traitements. En effet, le rôle central des DC humaines dans l'induction d'une réponse immune allogénique et les résultats obtenus sur le rôle du complexe ORAI-1 / STIM-1 font de ce complexe protéique une cible de choix dans le développement de traitements, par des molécules immunomodulatrices, pour pallier aux immunosuppresseurs.

Conclusion

L'objectif de cette thèse était de caractériser l'homéostasie calcique, au cours des événements précoces de la maturation des DC humaines. Pour la première fois, une entrée capacitive de Ca^{2+} (ECC) a été décrite, en réponse à une déplétion des stocks calciques, dans ce type cellulaire, suite aux stimuli de maturation (LPS, Zymosan ou $\text{TNF-}\alpha$). Le Ca^{2+} , entré par cette dernière, est utilisé comme second messager dans la DC humaine pour induire l'expression des marqueurs de maturation et la synthèse de cytokines.

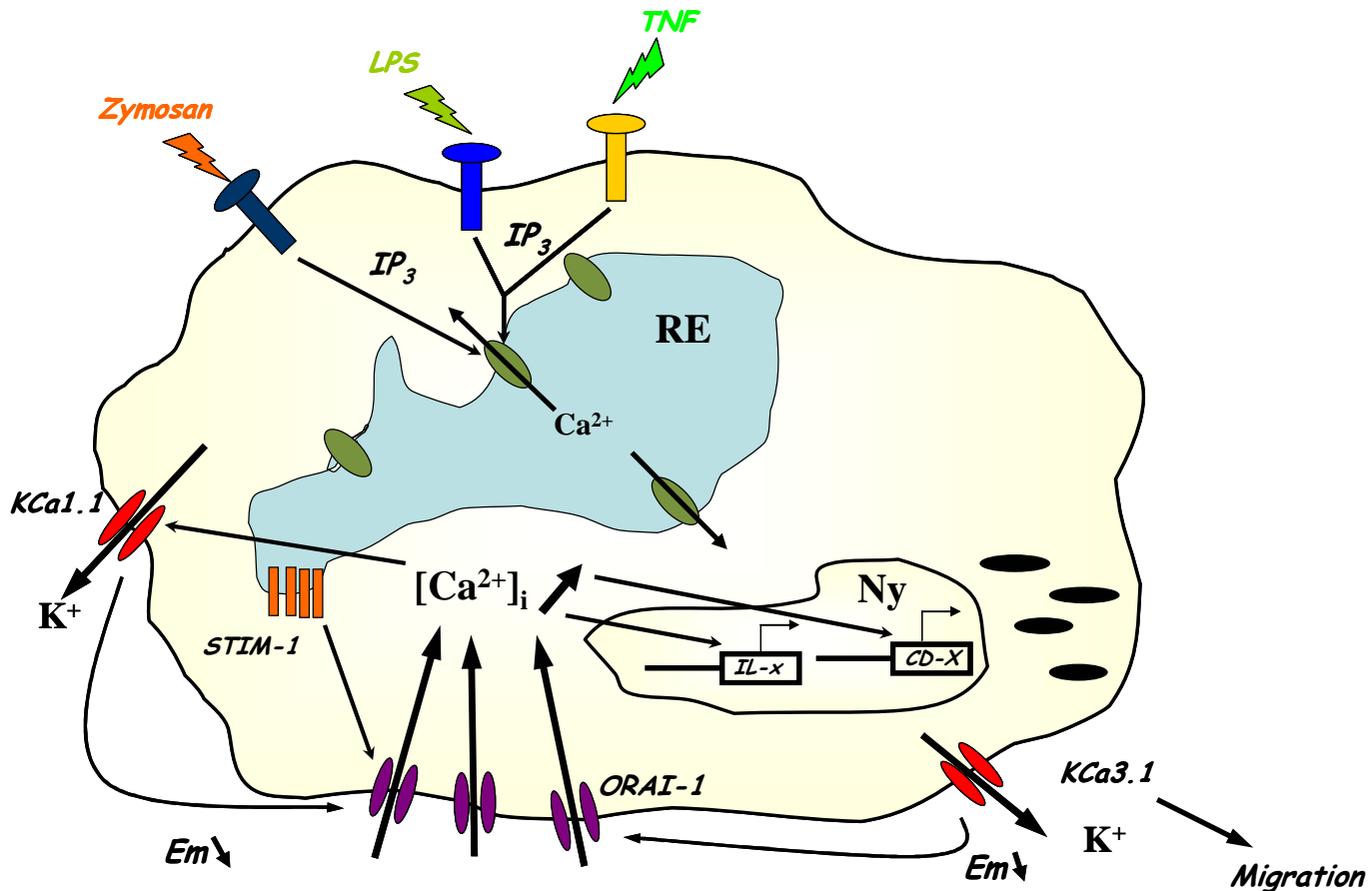


Figure 68 : Homéostasie calcique au cours des événements précoces de la maturation des DC humaines

De plus, nous avons pu mettre en évidence les structures protéiques responsables de cette ECC. Elle est gouvernée par le complexe ORAI et STIM. En effet, des expériences de microscopie confocale ont permis de dévoiler le rôle des protéines ORAI-1 et STIM-1 qui apparaissent co-localisées dans les DC humaines quel que soient les stimuli de maturation. Ces protéines semblent intervenir dans ce mécanisme SOCE car l'expression des marqueurs

de maturation et la synthèse de cytokines sont réduites lorsque leur expression protéique est inhibée par la technique d'ARN interférence.

Par ailleurs, des canaux potassiques, connus pour être activés par le Ca^{2+} intracellulaire, ont été retrouvés dans les DC humaines : les KCa1.1 et KCa3.1. Il apparaît donc que le canal KCa3.1 est impliqué dans la migration des DC immatures mais également des matures. En effet, *in vivo*, les DC vont répondre à la chimiokine CCL5 par la migration de la moëlle osseuse vers les tissus périphériques. De plus, l'inhibition de la capacité migratoire, par le TRAM-34, pourrait diminuer la migration des DC immatures vers leur lieu d'activation (les tissus périphériques). Ce canal va donc favoriser la migration vers les tissus périphériques. Par ailleurs, les DC matures vont migrer, en réponse au CCL19 ou CCL21, des tissus périphériques vers les organes lymphoïdes secondaires. L'activation de la migration, en réponse au CCL19, par la TRAM-34, pourrait permettre de conclure que ce canal jouerait un rôle inhibiteur sur la migration des DC matures vers les organes lymphoïdes secondaires, pour permettre l'activation des cellules T. Ce canal favoriserait donc un état quiescent dans les tissus périphériques. Ces résultats permettent d'envisager des pistes de développement d'alternatives thérapeutiques pour les problèmes de rejet de greffe. En effet, un traitement par un agoniste de ce canal permettrait aux DC humaines de rester en quiescence dans la moëlle osseuse. Ceci permettrait donc d'induire une tolérance immune pour éviter les rejets d'allogreffe. Enfin, d'autres thérapies, ciblant d'autres types de maladies comme le cancer, peuvent être envisagés pour stimuler la réponse immunitaire anti-tumorale, toujours en inhibant l'activité de ce canal. En effet, les DC humaines, activées par un stimulus tumoral, verraient leur migration augmentée et ainsi une augmentation de la réponse immune anti-tumorale serait observée.

En conclusion, les canaux ioniques (calciques et potassiques), régulant les principales fonctions des DC humaines, pourraient être des cibles privilégiées pour d'éventuel traitement contre des maladies auto-immunes, par exemple. De plus, des régulations d'expression ou d'activité de ces canaux permettraient, peut-être, d'induire un type de « tolérance immune », très utile, par exemple, dans le cas de la greffe d'organe.

Bibliographie

Travaux universitaires

CROTTÈS, David. *Etude des canaux potassiques dans la cellule dendritique humaine*. Mémoire de Master 2, Université François-Rabelais de Tours, 2010.

GILLET, Ludovic. *Implication des canaux sodiques dépendants du voltage dans l'invasivité de cellules cancéreuses mammaires et sa régulation par l'acide docosahexaénoïque*. Thèse de Doctorat, Université François-Rabelais de Tours, 2005.

LEMOINE, Roxane. *Propriétés régulatrices des cellules dendritiques humaines traitées par l'acide mycophénolique*. Thèse de Doctorat, Université François-Rabelais de Tours, 2009.

PINAULT, Coralie. *Les inhibiteurs calciques en transplantation rénale*. Thèse de Doctorat, Université François-Rabelais de Tours, 2010.

POTIER, Marie. *Rôle des canaux potassiques activés par le calcium et sensibles aux lipides dans la migration des cellules cancéreuses*. Thèse de Doctorat, Université François-Rabelais de Tours, 2006.

ROGER, Sébastien. *Intervention des canaux sodiques dépendants du voltage dans l'invasivité de cellules tumorales*. Thèse de Doctorat, Université François-Rabelais de Tours, 2005.

Ouvrages

Hille B. *Ionic channels of excitable membranes*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 1984.

Hille B. *Ionic channels of excitable membranes*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 2nd Ed., 1992.

Publications scientifiques internationales

Abraham, R. T. and G. J. Wiederrecht (1996). "Immunopharmacology of rapamycin." Annu Rev Immunol **14**: 483-510.

Ackerman, A. L. and P. Cresswell (2004). "Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens." Nat Immunol **5**(7): 678-84.

Adams, A. B., M. A. Williams, et al. (2003). "Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance." J Clin Invest **111**(12): 1887-95.

Adams, S., D. W. O'Neill, et al. (2005). "Recent advances in dendritic cell biology." J Clin Immunol **25**(3): 177-88.

Adu, D., J. Cross, et al. (2001). "Treatment of systemic lupus erythematosus with mycophenolate mofetil." Lupus **10**(3): 203-8.

Afzali, B., R. I. Lechler, et al. (2007). "Allorecognition and the alloresponse: clinical implications." Tissue Antigens **69**(6): 545-56.

Agrawal, S., A. Agrawal, et al. (2003). "Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of

- extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos." J Immunol **171**(10): 4984-9.
- Ahluwalia, J., A. Tinker, et al. (2004). "The large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel is essential for innate immunity." Nature **427**(6977): 853-8.
- Ahmad-Nejad, P., H. Hacker, et al. (2002). "Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments." Eur J Immunol **32**(7): 1958-68.
- Ahmadzadeh, M. and S. A. Rosenberg (2006). "IL-2 administration increases CD4⁺ CD25^(hi) Foxp3⁺ regulatory T cells in cancer patients." Blood **107**(6): 2409-14.
- Akbar, A. N., P. L. Amlot, et al. (1990). "The development of primed/memory CD8⁺ lymphocytes in vitro and in rejecting kidneys after transplantation." Clin Exp Immunol **81**(2): 225-31.
- Akira, S. and H. Hemmi (2003). "Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family." Immunol Lett **85**(2): 85-95.
- Akira, S. and K. Takeda (2004). "Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol **4**(7): 499-511.
- Akira, S., S. Uematsu, et al. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.
- Alexopoulou, L., A. C. Holt, et al. (2001). "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3." Nature **413**(6857): 732-8.
- Aliberti, J., C. Reis e Sousa, et al. (2000). "CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha⁺ dendritic cells." Nat Immunol **1**(1): 83-7.
- Allison, A. C. and E. M. Eugui (2000). "Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action." Immunopharmacology **47**(2-3): 85-118.
- Almawi, W. Y., H. N. Beyhum, et al. (1996). "Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids." J Leukoc Biol **60**(5): 563-72.
- Alters, S. E., J. R. Gadea, et al. (1999). "IL-13 can substitute for IL-4 in the generation of dendritic cells for the induction of cytotoxic T lymphocytes and gene therapy." J Immunother **22**(3): 229-36.
- Anderton, S. M. and D. C. Wraith (2002). "Selection and fine-tuning of the autoimmune T-cell repertoire." Nat Rev Immunol **2**(7): 487-98.
- Andreasen, S. O., J. E. Christensen, et al. (2000). "Role of CD40 ligand and CD28 in induction and maintenance of antiviral CD8⁺ effector T cell responses." J Immunol **164**(7): 3689-97.
- Andrejeva, J., K. S. Childs, et al. (2004). "The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(49): 17264-9.
- Annacker, O., C. Asseman, et al. (2003). "Interleukin-10 in the regulation of T cell-induced colitis." J Autoimmun **20**(4): 277-9.
- Ardeshna, K. M., A. R. Pizzey, et al. (2000). "The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells." Blood **96**(3): 1039-46.
- Arikkath, J. and K. P. Campbell (2003). "Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex." Curr Opin Neurobiol **13**(3): 298-307.
- Arrighi, J. F., M. Rebsamen, et al. (2001). "A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers." J Immunol **166**(6): 3837-45.
- Baba, Y. and T. Kurosaki (2009). "Physiological function and molecular basis of STIM1-mediated calcium entry in immune cells." Immunol Rev **231**(1): 174-88.

- Baba, Y., K. Nishida, et al. (2008). "Essential function for the calcium sensor STIM1 in mast cell activation and anaphylactic responses." Nat Immunol **9**(1): 81-8.
- Baban, B., P. R. Chandler, et al. (2009). "IDO activates regulatory T cells and blocks their conversion into Th17-like T cells." J Immunol **183**(4): 2475-83.
- Bacchetta, R., M. Bigler, et al. (1994). "High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells." J Exp Med **179**(2): 493-502.
- Baecher-Allan, C., J. A. Brown, et al. (2001). "CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood." J Immunol **167**(3): 1245-53.
- Baggiolini, M., B. Dewald, et al. (1997). "Human chemokines: an update." Annu Rev Immunol **15**: 675-705.
- Banchereau, J., F. Briere, et al. (2000). "Immunobiology of dendritic cells." Annu Rev Immunol **18**: 767-811.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-52.
- Barbet, G., M. Demion, et al. (2008). "The calcium-activated nonselective cation channel TRPM4 is essential for the migration but not the maturation of dendritic cells." Nat Immunol **9**(10): 1148-56.
- Barbieri, M. A., A. D. Kohn, et al. (1998). "Protein kinase B/akt and rab5 mediate Ras activation of endocytosis." J Biol Chem **273**(31): 19367-70.
- Barker, C. F. and R. E. Billingham (1977). "Immunologically privileged sites." Adv Immunol **25**: 1-54.
- Battaglia, M. and M. G. Roncarolo (2006). "Induction of transplantation tolerance via regulatory T cells." Inflamm Allergy Drug Targets **5**(3): 157-65.
- Battaglia, M., A. Stabilini, et al. (2005). "Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells." Blood **105**(12): 4743-8.
- Bayry, J., F. Triebel, et al. (2007). "Human dendritic cells acquire a semimature phenotype and lymph node homing potential through interaction with CD4+CD25+ regulatory T cells." J Immunol **178**(7): 4184-93.
- Benichou, G. (1999). "Direct and indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection." Front Biosci **4**: D476-80.
- Benichou, G., E. Fedoseyeva, et al. (1994). "Limited T cell response to donor MHC peptides during allograft rejection. Implications for selective immune therapy in transplantation." J Immunol **153**(3): 938-45.
- Benichou, G., K. M. Malloy, et al. (1998). "The presentation of self and allogeneic MHC peptides to T lymphocytes." Hum Immunol **59**(9): 540-8.
- Benichou, G., P. A. Takizawa, et al. (1992). "Donor major histocompatibility complex (MHC) peptides are presented by recipient MHC molecules during graft rejection." J Exp Med **175**(1): 305-8.
- Benichou, G., A. Valujskikh, et al. (1999). "Contributions of direct and indirect T cell alloreactivity during allograft rejection in mice." J Immunol **162**(1): 352-8.
- Berkefeld, H., C. A. Sailer, et al. (2006). "BKCa-Cav channel complexes mediate rapid and localized Ca²⁺-activated K⁺ signaling." Science **314**(5799): 615-20.
- Berridge, M. J., M. D. Bootman, et al. (2003). "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(7): 517-29.
- Berridge, M. J., P. Lipp, et al. (2000). "The versatility and universality of calcium signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 11-21.
- Bers, D. M. (2002). "Cardiac excitation-contraction coupling." Nature **415**(6868): 198-205.

- Bestard, O., P. Nickel, et al. (2008). "Circulating alloreactive T cells correlate with graft function in longstanding renal transplant recipients." J Am Soc Nephrol **19**(7): 1419-29.
- Biragyn, A., P. A. Ruffini, et al. (2002). "Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2." Science **298**(5595): 1025-9.
- Birx, D. L., M. Berger, et al. (1984). "The interference of T cell activation by calcium channel blocking agents." J Immunol **133**(6): 2904-9.
- Blackman, M. A., H. Gerhard-Burgert, et al. (1990). "A role for clonal inactivation in T cell tolerance to Mls-1a." Nature **345**(6275): 540-2.
- Boisleve, F., S. Kerdine-Romer, et al. (2005). "Implication of the MAPK pathways in the maturation of human dendritic cells induced by nickel and TNF-alpha." Toxicology **206**(2): 233-44.
- Bopp, T., C. Becker, et al. (2007). "Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression." J Exp Med **204**(6): 1303-10.
- Bordey, A., H. Sontheimer, et al. (2000). "Muscarinic activation of BK channels induces membrane oscillations in glioma cells and leads to inhibition of cell migration." J Membr Biol **176**(1): 31-40.
- Borkowski, T. A., J. J. Letterio, et al. (1996). "A role for endogenous transforming growth factor beta 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor beta 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells." J Exp Med **184**(6): 2417-22.
- Borsellino, G., M. Kleinewietfeld, et al. (2007). "Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression." Blood **110**(4): 1225-32.
- Bracci, L., M. Vukcevic, et al. (2007). "Ca²⁺ signaling through ryanodine receptor 1 enhances maturation and activation of human dendritic cells." J Cell Sci **120**(Pt 13): 2232-40.
- Bradley, J. R. (2008). "TNF-mediated inflammatory disease." J Pathol **214**(2): 149-60.
- Braun, A., J. E. Gessner, et al. (2009). "STIM1 is essential for Fcγ receptor activation and autoimmune inflammation." Blood **113**(5): 1097-104.
- Braun, D., R. S. Longman, et al. (2005). "A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation." Blood **106**(7): 2375-81.
- Brawand, P., D. R. Fitzpatrick, et al. (2002). "Murine plasmacytoid pre-dendritic cells generated from Flt3 ligand-supplemented bone marrow cultures are immature APCs." J Immunol **169**(12): 6711-9.
- Brunner, T., R. J. Mogil, et al. (1995). "Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas." Nature **373**(6513): 441-4.
- Bu, P., A. Keshavarzian, et al. (2001). "Apoptosis: one of the mechanisms that maintains unresponsiveness of the intestinal mucosal immune system." J Immunol **166**(10): 6399-403.
- Bubien, J. K., L. J. Zhou, et al. (1993). "Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca²⁺ conductance found constitutively in B lymphocytes." J Cell Biol **121**(5): 1121-32.
- Bumgardner, G. L., D. Gao, et al. (2000). "Rejection responses to allogeneic hepatocytes by reconstituted SCID mice, CD4, KO, and CD8 KO mice." Transplantation **70**(12): 1771-80.
- Burnham, M. P., R. Bychkov, et al. (2002). "Characterization of an apamin-sensitive small-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel in porcine coronary artery endothelium: relevance to EDHF." Br J Pharmacol **135**(5): 1133-43.

- Cabral, M. D., P. E. Paulet, et al. (2010). "Knocking down Cav1 calcium channels implicated in Th2 cell activation prevents experimental asthma." Am J Respir Crit Care Med **181**(12): 1310-7.
- Cahalan, M. D. (2009). "STIMulating store-operated Ca(2+) entry." Nat Cell Biol **11**(6): 669-77.
- Cahalan, M. D., H. Wulff, et al. (2001). "Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system." J Clin Immunol **21**(4): 235-52.
- Cahalan, M. D., S. L. Zhang, et al. (2007). "Molecular basis of the CRAC channel." Cell Calcium **42**(2): 133-44.
- Calloway, N., M. Vig, et al. (2009). "Molecular clustering of STIM1 with Orai1/CRACM1 at the plasma membrane depends dynamically on depletion of Ca²⁺ stores and on electrostatic interactions." Mol Biol Cell **20**(1): 389-99.
- Campbell, W. B., D. Gebremedhin, et al. (1996). "Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors." Circ Res **78**(3): 415-23.
- Cantiello, H. F., A. G. Prat, et al. (1993). "Actin-binding protein contributes to cell volume regulatory ion channel activation in melanoma cells." J Biol Chem **268**(7): 4596-9.
- Cao, X., S. F. Cai, et al. (2007). "Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance." Immunity **27**(4): 635-46.
- Carafoli, E. (2002). "Calcium signaling: a tale for all seasons." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(3): 1115-22.
- Cardin, R. D., J. W. Brooks, et al. (1996). "Progressive loss of CD8+ T cell-mediated control of a gamma-herpesvirus in the absence of CD4+ T cells." J Exp Med **184**(3): 863-71.
- Caron, G., Y. Delneste, et al. (2001). "Histamine polarizes human dendritic cells into Th2 cell-promoting effector dendritic cells." J Immunol **167**(7): 3682-6.
- Catterall, W. A. (2000). "Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels." Annu Rev Cell Dev Biol **16**: 521-55.
- Catterall, W. A., E. Perez-Reyes, et al. (2005). "International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels." Pharmacol Rev **57**(4): 411-25.
- Caux, C., C. Massacrier, et al. (1994). "Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking." J Exp Med **180**(4): 1263-72.
- Caux, C., B. Vanbervliet, et al. (1996). "CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha." J Exp Med **184**(2): 695-706.
- Caux, C., B. Vanbervliet, et al. (1996). "Interleukin-3 cooperates with tumor necrosis factor alpha for the development of human dendritic/Langerhans cells from cord blood CD34+ hematopoietic progenitor cells." Blood **87**(6): 2376-85.
- Cederbom, L., H. Hall, et al. (2000). "CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells." Eur J Immunol **30**(6): 1538-43.
- Chandy, K. G., T. E. DeCoursey, et al. (1984). "Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation." J Exp Med **160**(2): 369-85.
- Chandy, K. G., T. E. DeCoursey, et al. (1986). "Altered K⁺ channel expression in abnormal T lymphocytes from mice with the lpr gene mutation." Science **233**(4769): 1197-200.
- Chandy, K. G., H. Wulff, et al. (2004). "K⁺ channels as targets for specific immunomodulation." Trends Pharmacol Sci **25**(5): 280-9.
- Chang, C. C., R. Ciubotariu, et al. (2002). "Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4." Nat Immunol **3**(3): 237-43.
- Chantome, A., A. Girault, et al. (2009). "KCa_{2.3} channel-dependent hyperpolarization increases melanoma cell motility." Exp Cell Res **315**(20): 3620-30.

- Charnet, P., E. Bourinet, et al. (1994). "Calcium currents recorded from a neuronal alpha 1C L-type calcium channel in *Xenopus oocytes*." FEBS Lett **344**(1): 87-90.
- Chauveau, C., S. Remy, et al. (2005). "Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression." Blood **106**(5): 1694-702.
- Chiang, P. H., L. Wang, et al. (2004). "Mechanistic insights into impaired dendritic cell function by rapamycin: inhibition of Jak2/Stat4 signaling pathway." J Immunol **172**(3): 1355-63.
- Chiang, P. H., L. Wang, et al. (2002). "Inhibition of IL-12 signaling Stat4/IFN-gamma pathway by rapamycin is associated with impaired dendritic [correction of dendritic] cell function." Transplant Proc **34**(5): 1394-5.
- Chow, A., D. Toomre, et al. (2002). "Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane." Nature **418**(6901): 988-94.
- Chuang, Y. H., J. L. Suen, et al. (2006). "Fas-ligand-expressing adenovirus-transfected dendritic cells decrease allergen-specific T cells and airway inflammation in a murine model of asthma." J Mol Med **84**(7): 595-603.
- Colic, M., Z. Stojic-Vukanic, et al. (2003). "Mycophenolate mofetil inhibits differentiation, maturation and allostimulatory function of human monocyte-derived dendritic cells." Clin Exp Immunol **134**(1): 63-9.
- Colonna, M., G. Trinchieri, et al. (2004). "Plasmacytoid dendritic cells in immunity." Nat Immunol **5**(12): 1219-26.
- Condon, C., S. C. Watkins, et al. (1996). "DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells." Nat Med **2**(10): 1122-8.
- Cook, D. N., D. M. Prosser, et al. (2000). "CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue." Immunity **12**(5): 495-503.
- Coomes, J. L., K. R. Siddiqui, et al. (2007). "A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism." J Exp Med **204**(8): 1757-64.
- Cresswell, P. (1994). "Antigen presentation. Getting peptides into MHC class II molecules." Curr Biol **4**(6): 541-3.
- Cross, N. B., A. C. Webster, et al. (2009). "Antihypertensives for kidney transplant recipients: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials." Transplantation **88**(1): 7-18.
- Csencsits, K. L. and D. K. Bishop (2003). "Contrasting alloreactive CD4+ and CD8+ T cells: there's more to it than MHC restriction." Am J Transplant **3**(2): 107-15.
- Cunningham, C. C., J. B. Gorlin, et al. (1992). "Actin-binding protein requirement for cortical stability and efficient locomotion." Science **255**(5042): 325-7.
- Curotto de Lafaille, M. A. and J. J. Lafaille (2002). "CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy." Curr Opin Immunol **14**(6): 771-8.
- Czerniecki, B. J., C. Carter, et al. (1997). "Calcium ionophore-treated peripheral blood monocytes and dendritic cells rapidly display characteristics of activated dendritic cells." J Immunol **159**(8): 3823-37.
- Dai, S., D. D. Hall, et al. (2009). "Supramolecular assemblies and localized regulation of voltage-gated ion channels." Physiol Rev **89**(2): 411-52.
- D'Amico, A. and L. Wu (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**(2): 293-303.
- de Heer, H. J., H. Hammad, et al. (2005). "Dendritic cell subsets and immune regulation in the lung." Semin Immunol **17**(4): 295-303.

- de Jong, E. C., P. L. Vieira, et al. (1999). "Corticosteroids inhibit the production of inflammatory mediators in immature monocyte-derived DC and induce the development of tolerogenic DC3." *J Leukoc Biol* **66**(2): 201-4.
- Deaglio, S., K. M. Dwyer, et al. (2007). "Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression." *J Exp Med* **204**(6): 1257-65.
- Delgado, M. (2009). "Generating Tolerogenic Dendritic Cells with Neuropeptides." *Hum Immunol*.
- Di Leva, F., T. Domi, et al. (2008). "The plasma membrane Ca²⁺ ATPase of animal cells: structure, function and regulation." *Arch Biochem Biophys* **476**(1): 65-74.
- Dieu, M. C., B. Vanbervliet, et al. (1998). "Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites." *J Exp Med* **188**(2): 373-86.
- Dillon, S., A. Agrawal, et al. (2004). "A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells." *J Immunol* **172**(8): 4733-43.
- Dolmetsch, R. E., R. S. Lewis, et al. (1997). "Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration." *Nature* **386**(6627): 855-8.
- Dolmetsch, R. E., K. Xu, et al. (1998). "Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression." *Nature* **392**(6679): 933-6.
- Dong, C., R. J. Davis, et al. (2002). "MAP kinases in the immune response." *Annu Rev Immunol* **20**: 55-72.
- Donmez, A., D. Karaaslan, et al. (1999). "The effects of diltiazem and dopamine on early graft function in renal transplant recipients." *Transplant Proc* **31**(8): 3305-6.
- Donnadieu, E., G. Bismuth, et al. (1992). "Calcium fluxes in T lymphocytes." *J Biol Chem* **267**(36): 25864-72.
- Doupnik, C. A., N. F. Lim, et al. (1995). "Intrinsic gating properties of a cloned G protein-activated inward rectifier K⁺ channel." *J Gen Physiol* **106**(1): 1-23.
- Dubsky, P. C., J. Friedl, et al. (2006). "Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase inhibition by mycophenolic acid impairs maturation and function of dendritic cells." *Clin Chim Acta* **364**(1-2): 139-47.
- Duffy, S. M., G. Cruse, et al. (2008). "Engagement of the EP2 prostanoid receptor closes the K⁺ channel KCa3.1 in human lung mast cells and attenuates their migration." *Eur J Immunol* **38**(9): 2548-56.
- Dumitriu, I. E., P. Baruah, et al. (2005). "Requirement of HMGB1 and RAGE for the maturation of human plasmacytoid dendritic cells." *Eur J Immunol* **35**(7): 2184-90.
- Dumitriu, I. E., M. E. Bianchi, et al. (2007). "The secretion of HMGB1 is required for the migration of maturing dendritic cells." *J Leukoc Biol* **81**(1): 84-91.
- Dumont, F. J., M. R. Melino, et al. (1990). "The immunosuppressive macrolides FK-506 and rapamycin act as reciprocal antagonists in murine T cells." *J Immunol* **144**(4): 1418-24.
- Duperrier, K., A. Farre, et al. (2002). "Cyclosporin A inhibits dendritic cell maturation promoted by TNF-alpha or LPS but not by double-stranded RNA or CD40L." *J Leukoc Biol* **72**(5): 953-61.
- Dziadek, M. A. and L. S. Johnstone (2007). "Biochemical properties and cellular localisation of STIM proteins." *Cell Calcium* **42**(2): 123-32.
- Ebner, S., Z. Ehammer, et al. (2004). "Expression of C-type lectin receptors by subsets of dendritic cells in human skin." *Int Immunol* **16**(6): 877-87.

- Edberg, J. C., J. J. Moon, et al. (1998). "Differential regulation of human neutrophil FcγRIIIa (CD32) and FcγRIIIb (CD16)-induced Ca²⁺ transients." *J Biol Chem* **273**(14): 8071-9.
- Eddy, R. J., L. M. Pierini, et al. (2000). "Ca²⁺-dependent myosin II activation is required for uropod retraction during neutrophil migration." *J Cell Sci* **113** (Pt 7): 1287-98.
- Edwards, S. W., F. Watson, et al. (1997). "Activation of human neutrophils by soluble immune complexes: role of Fc γ RII and Fc γ RIIIb in stimulation of the respiratory burst and elevation of intracellular Ca²⁺." *Ann N Y Acad Sci* **832**: 341-57.
- Erhardt, A., M. Biburger, et al. (2007). "IL-10, regulatory T cells, and Kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A-induced liver injury in mice." *Hepatology* **45**(2): 475-85.
- Fadilah, S. A., S. Vuckovic, et al. (2007). "Cord blood CD34⁺ cells cultured with FLT3L, stem cell factor, interleukin-6, and IL-3 produce CD11c⁺CD1a⁻/c⁻ myeloid dendritic cells." *Stem Cells Dev* **16**(5): 849-55.
- Fallarino, F., U. Grohmann, et al. (2003). "Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells." *Nat Immunol* **4**(12): 1206-12.
- Fanger, C. M., S. Ghanshani, et al. (1999). "Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance K_{Ca} channel, IKCa1." *J Biol Chem* **274**(9): 5746-54.
- Fanger, C. M., M. Hoth, et al. (1995). "Characterization of T cell mutants with defects in capacitative calcium entry: genetic evidence for the physiological roles of CRAC channels." *J Cell Biol* **131**(3): 655-67.
- Feske, S. (2007). "Calcium signalling in lymphocyte activation and disease." *Nat Rev Immunol* **7**(9): 690-702.
- Feske, S. (2009). "ORAI1 and STIM1 deficiency in human and mice: roles of store-operated Ca²⁺ entry in the immune system and beyond." *Immunol Rev* **231**(1): 189-209.
- Feske, S., J. Giltzane, et al. (2001). "Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes." *Nat Immunol* **2**(4): 316-24.
- Feske, S., Y. Gwack, et al. (2006). "A mutation in Orail causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function." *Nature* **441**(7090): 179-85.
- Feske, S., M. Prakriya, et al. (2005). "A severe defect in CRAC Ca²⁺ channel activation and altered K⁺ channel gating in T cells from immunodeficient patients." *J Exp Med* **202**(5): 651-62.
- Flano, E., D. L. Woodland, et al. (1999). "Requirement for CD4⁺ T cells in V beta 4⁺CD8⁺ T cell activation associated with latent murine gammaherpesvirus infection." *J Immunol* **163**(6): 3403-8.
- Floto, R. A., P. A. MacAry, et al. (2006). "Dendritic cell stimulation by mycobacterial Hsp70 is mediated through CCR5." *Science* **314**(5798): 454-8.
- Fomina, A. F., C. M. Fanger, et al. (2000). "Single channel properties and regulated expression of Ca(2+) release-activated Ca(2+) (CRAC) channels in human T cells." *J Cell Biol* **150**(6): 1435-44.
- Fritz, J. H., S. E. Girardin, et al. (2005). "Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists." *Eur J Immunol* **35**(8): 2459-70.
- Gallin, E. K. (1984). "Calcium- and voltage-activated potassium channels in human macrophages." *Biophys J* **46**(6): 821-5.
- Gallucci, S., M. Lolkema, et al. (1999). "Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells." *Nat Med* **5**(11): 1249-55.
- Garin, M. I., C. C. Chu, et al. (2007). "Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4⁺CD25⁺ T cells." *Blood* **109**(5): 2058-65.

- Geijtenbeek, T. B., D. J. Krooshoop, et al. (2000). "DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking." *Nat Immunol* **1**(4): 353-7.
- Geijtenbeek, T. B., R. Torensma, et al. (2000). "Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses." *Cell* **100**(5): 575-85.
- Geissmann, F., C. Prost, et al. (1998). "Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells." *J Exp Med* **187**(6): 961-6.
- Geissmann, F., P. Revy, et al. (1999). "TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells." *J Immunol* **162**(8): 4567-75.
- Gelman, A. E., M. Okazaki, et al. (2008). "CD4+ T lymphocytes are not necessary for the acute rejection of vascularized mouse lung transplants." *J Immunol* **180**(7): 4754-62.
- Geng, L., G. Jiang, et al. (2006). "Mycophenolic acid upregulates B7-DC expression on dendritic cells, which is associated with impaired allostimulatory capacity of dendritic cells." *Transplant Proc* **38**(5): 1622-4.
- Gerosa, F., B. Baldani-Guerra, et al. (2002). "Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells." *J Exp Med* **195**(3): 327-33.
- Gershon, R. K. and K. Kondo (1970). "Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes." *Immunology* **18**(5): 723-37.
- Gilliet, M., A. Boonstra, et al. (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**(7): 953-8.
- Girard, C. and F. Lesage (2004). "[Neuronal background two-P-domain potassium channels: molecular and functional aspects]." *Med Sci (Paris)* **20**(5): 544-9.
- Gonzalez-Rey, E., A. Chorny, et al. (2006). "Vasoactive intestinal peptide generates human tolerogenic dendritic cells that induce CD4 and CD8 regulatory T cells." *Blood* **107**(9): 3632-8.
- Gordon, S. (2002). "Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response." *Cell* **111**(7): 927-30.
- Gould, D. S. and H. Auchincloss, Jr. (1999). "Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection." *Immunol Today* **20**(2): 77-82.
- Grafton, G., L. Stokes, et al. (2003). "A non-voltage-gated calcium channel with L-type characteristics activated by B cell receptor ligation." *Biochem Pharmacol* **66**(10): 2001-9.
- Green, E. A., L. Gorelik, et al. (2003). "CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(19): 10878-83.
- Grissmer, S., A. N. Nguyen, et al. (1993). "Calcium-activated potassium channels in resting and activated human T lymphocytes. Expression levels, calcium dependence, ion selectivity, and pharmacology." *J Gen Physiol* **102**(4): 601-30.
- Grohmann, U., C. Orabona, et al. (2002). "CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo." *Nat Immunol* **3**(11): 1097-101.
- Grossman, W. J., J. W. Verbsky, et al. (2004). "Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells." *Blood* **104**(9): 2840-8.
- Groux, H., M. Bigler, et al. (1996). "Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells." *J Exp Med* **184**(1): 19-29.
- Groux, H., A. O'Garra, et al. (1997). "A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis." *Nature* **389**(6652): 737-42.

- Guermonprez, P. and S. Amigorena (2005). "Pathways for antigen cross presentation." Springer Semin Immunopathol **26**(3): 257-71.
- Guermonprez, P., L. Saveanu, et al. (2003). "ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells." Nature **425**(6956): 397-402.
- Guermonprez, P., J. Valladeau, et al. (2002). "Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells." Annu Rev Immunol **20**: 621-67.
- Guo, Z., L. Meng, et al. (2001). "CD8 T cell-mediated rejection of intestinal allografts is resistant to inhibition of the CD40/CD154 costimulatory pathway." Transplantation **71**(9): 1351-4.
- Gutman, G. A., K. G. Chandy, et al. (2003). "International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels." Pharmacol Rev **55**(4): 583-6.
- Gwack, Y., S. Feske, et al. (2007). "Signalling to transcription: store-operated Ca²⁺ entry and NFAT activation in lymphocytes." Cell Calcium **42**(2): 145-56.
- Gwack, Y., S. Srikanth, et al. (2007). "Biochemical and functional characterization of Orai proteins." J Biol Chem **282**(22): 16232-43.
- Habiro, K., H. Shimmura, et al. (2005). "Effect of inflammation on costimulation blockade-resistant allograft rejection." Am J Transplant **5**(4 Pt 1): 702-11.
- Hackstein, H., A. E. Morelli, et al. (2001). "Aspirin inhibits in vitro maturation and in vivo immunostimulatory function of murine myeloid dendritic cells." J Immunol **166**(12): 7053-62.
- Hackstein, H., T. Taner, et al. (2003). "Rapamycin inhibits IL-4--induced dendritic cell maturation in vitro and dendritic cell mobilization and function in vivo." Blood **101**(11): 4457-63.
- Hackstein, H. and A. W. Thomson (2004). "Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs." Nat Rev Immunol **4**(1): 24-34.
- Hamdi, H., V. Godot, et al. (2007). "Induction of antigen-specific regulatory T lymphocytes by human dendritic cells expressing the glucocorticoid-induced leucine zipper." Blood **110**(1): 211-9.
- Hamill, O. P., A. Marty, et al. (1981). "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." Pflugers Arch **391**(2): 85-100.
- Hara, Y., M. Wakamori, et al. (2002). "LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death." Mol Cell **9**(1): 163-73.
- Hart, D. N. (1997). "Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response." Blood **90**(9): 3245-87.
- Hart, D. N. and J. L. McKenzie (1988). "Isolation and characterization of human tonsil dendritic cells." J Exp Med **168**(1): 157-70.
- Haskova, Z., N. Usiu, et al. (2000). "CD4+ T cells are critical for corneal, but not skin, allograft rejection." Transplantation **69**(4): 483-7.
- Hawrylowicz, C. M. and A. O'Garra (2005). "Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma." Nat Rev Immunol **5**(4): 271-83.
- Hazeki, K., K. Nigorikawa, et al. (2007). "Role of phosphoinositide 3-kinase in innate immunity." Biol Pharm Bull **30**(9): 1617-23.
- Heath, W. R., G. T. Belz, et al. (2004). "Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens." Immunol Rev **199**: 9-26.
- Heath, W. R. and F. R. Carbone (2001). "Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance." Nat Rev Immunol **1**(2): 126-34.

- Heil, F., P. Ahmad-Nejad, et al. (2003). "The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily." Eur J Immunol **33**(11): 2987-97.
- Hemmi, H., O. Takeuchi, et al. (2000). "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA." Nature **408**(6813): 740-5.
- Hemmi, H., M. Yoshino, 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**(5): 695-704.
- Herchuelz, A. (2007). "Historical note regarding the discovery of the Na/Ca exchanger and the PMCA." Ann N Y Acad Sci **1099**: xvii-xviii.
- Herrera, G. M., M. J. Pozo, et al. (2003). "Urinary bladder instability induced by selective suppression of the murine small conductance calcium-activated potassium (SK3) channel." J Physiol **551**(Pt 3): 893-903.
- Hilchey, S. P., A. De, et al. (2007). "Follicular lymphoma intratumoral CD4+CD25+GITR+ regulatory T cells potently suppress CD3/CD28-costimulated autologous and allogeneic CD8+CD25- and CD4+CD25- T cells." J Immunol **178**(7): 4051-61.
- Hill, J. A., T. E. Ichim, et al. (2003). "Immune modulation by silencing IL-12 production in dendritic cells using small interfering RNA." J Immunol **171**(2): 691-6.
- Hisatsune, C., K. Nakamura, et al. (2005). "Amplification of Ca²⁺ signaling by diacylglycerol-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production." J Biol Chem **280**(12): 11723-30.
- Hoenderop, J. G., B. Nilius, et al. (2005). "Calcium absorption across epithelia." Physiol Rev **85**(1): 373-422.
- Hogan, P. G., L. Chen, et al. (2003). "Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT." Genes Dev **17**(18): 2205-32.
- Holzelova, E., C. Vonarbourg, et al. (2004). "Autoimmune lymphoproliferative syndrome with somatic Fas mutations." N Engl J Med **351**(14): 1409-18.
- Horibe, E. K., J. Sacks, et al. (2008). "Rapamycin-conditioned, alloantigen-pulsed dendritic cells promote indefinite survival of vascularized skin allografts in association with T regulatory cell expansion." Transpl Immunol **18**(4): 307-18.
- Hornung, V., S. Rothenfusser, et al. (2002). "Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides." J Immunol **168**(9): 4531-7.
- Hoth, M. and R. Penner (1992). "Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells." Nature **355**(6358): 353-6.
- Hsu, S., P. J. O'Connell, et al. (2001). "Fundamental Ca²⁺ signaling mechanisms in mouse dendritic cells: CRAC is the major Ca²⁺ entry pathway." J Immunol **166**(10): 6126-33.
- Huang, F. P., N. Platt, et al. (2000). "A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes." J Exp Med **191**(3): 435-44.
- Huang, G. N., W. Zeng, et al. (2006). "STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels." Nat Cell Biol **8**(9): 1003-10.
- Huang, Y. M., Y. Hussien, et al. (2001). "Interferon-beta induces the development of type 2 dendritic cells." Cytokine **13**(5): 264-71.
- Hulme, J. T., T. W. Lin, et al. (2003). "Beta-adrenergic regulation requires direct anchoring of PKA to cardiac CaV1.2 channels via a leucine zipper interaction with A kinase-anchoring protein 15." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(22): 13093-8.
- Hunger, R. E., P. A. Sieling, et al. (2004). "Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells." J Clin Invest **113**(5): 701-8.

- Ichikawa, H. T., L. P. Williams, et al. (2002). "Activation of APCs through CD40 or Toll-like receptor 9 overcomes tolerance and precipitates autoimmune disease." J Immunol **169**(5): 2781-7.
- Inaba, K. and R. M. Steinman (1987). "Dendritic and B-cell function during antibody responses in normal and immunodeficient (xid) mouse spleen cultures." Cell Immunol **105**(2): 432-42.
- Ingsathit, A., V. Sumethkul, et al. (2006). "Co-administration of diltiazem and cyclosporine for kidney transplant recipients: a four year follow-up study." J Med Assoc Thai **89 Suppl 2**: S235-41.
- Inohara, N., T. Koseki, et al. (1999). "Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB." J Biol Chem **274**(21): 14560-7.
- Inohara, N., Y. Ogura, et al. (2003). "Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease." J Biol Chem **278**(8): 5509-12.
- Ip, W. K. and Y. L. Lau (2004). "Distinct maturation of, but not migration between, human monocyte-derived dendritic cells upon ingestion of apoptotic cells of early or late phases." J Immunol **173**(1): 189-96.
- Ishii, T. M., C. Silvia, et al. (1997). "A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(21): 11651-6.
- Ito, T., R. Amakawa, et al. (2004). "Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs." J Immunol **172**(7): 4253-9.
- Ito, T., M. Inaba, et al. (1999). "A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells." J Immunol **163**(3): 1409-19.
- Ito, T., Y. H. Wang, et al. (2005). "Plasmacytoid dendritic cell precursors/type I interferon-producing cells sense viral infection by Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR9." Springer Semin Immunopathol **26**(3): 221-9.
- Ito, T., M. Yang, et al. (2007). "Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand." J Exp Med **204**(1): 105-15.
- Ivars, F. (1992). "T cell subset-specific expression of antigen receptor beta chains in alpha chain-transgenic mice." Eur J Immunol **22**(3): 635-9.
- Iwasaki, A. (2007). "Mucosal dendritic cells." Annu Rev Immunol **25**: 381-418.
- Jager, H., T. Dreker, et al. (2004). "Blockage of intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels inhibit human pancreatic cancer cell growth in vitro." Mol Pharmacol **65**(3): 630-8.
- Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." Annu Rev Immunol **20**: 197-216.
- Jankovic, D., M. C. Kullberg, et al. (2007). "Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection." J Exp Med **204**(2): 273-83.
- Jayakumar, A., M. J. Donovan, et al. (2008). "Leishmania major infection activates NF-kappaB and interferon regulatory factors 1 and 8 in human dendritic cells." Infect Immun **76**(5): 2138-48.
- Ji, W., P. Xu, et al. (2008). "Functional stoichiometry of the unitary calcium-release-activated calcium channel." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(36): 13668-73.
- Jiang, A., O. Bloom, et al. (2007). "Disruption of E-cadherin-mediated adhesion induces a functionally distinct pathway of dendritic cell maturation." Immunity **27**(4): 610-24.
- Jiang, S., O. Herrera, et al. (2004). "New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance." Curr Opin Immunol **16**(5): 550-7.

- Joetham, A., K. Takeda, et al. (2007). "Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta." J Immunol **178**(3): 1433-42.
- Johansson, C. and B. L. Kelsall (2005). "Phenotype and function of intestinal dendritic cells." Semin Immunol **17**(4): 284-94.
- Joiner, W. J., L. Y. Wang, et al. (1997). "hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(20): 11013-8.
- Jones, N. D., M. Carvalho-Gaspar, et al. (2006). "Effector and memory CD8+ T cells can be generated in response to alloantigen independently of CD4+ T cell help." J Immunol **176**(4): 2316-23.
- Jonuleit, H., U. Kuhn, et al. (1997). "Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions." Eur J Immunol **27**(12): 3135-42.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, et al. (2000). "Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells." J Exp Med **192**(9): 1213-22.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, et al. (2001). "Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood." J Exp Med **193**(11): 1285-94.
- Kabelitz, D., T. Pohl, et al. (1993). "Activation-induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes." Immunol Today **14**(7): 338-9.
- Kaisho, T. and S. Akira (2006). "Toll-like receptor function and signaling." J Allergy Clin Immunol **117**(5): 979-87; quiz 988.
- Kanazawa, N. (2007). "Dendritic cell immunoreceptors: C-type lectin receptors for pattern-recognition and signaling on antigen-presenting cells." J Dermatol Sci **45**(2): 77-86.
- Karsunky, H., M. Merad, et al. (2003). "Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo." J Exp Med **198**(2): 305-13.
- Karulin, A. Y., M. D. Hesse, et al. (2000). "Single-cytokine-producing CD4 memory cells predominate in type 1 and type 2 immunity." J Immunol **164**(4): 1862-72.
- Kast, W. M., E. Van Twuyver, et al. (1988). "Mechanism of skin allograft enhancement across an H-2 class I mutant difference. Evidence for involvement of veto cells." Eur J Immunol **18**(12): 2105-8.
- Katz, S. I., K. Tamaki, et al. (1979). "Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow." Nature **282**(5736): 324-6.
- Kawai, T. and S. Akira (2007). "Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors." Trends Mol Med **13**(11): 460-9.
- King, L. B. and B. D. Freedman (2009). "B-lymphocyte calcium influx." Immunol Rev **231**(1): 265-77.
- Kobayashi, K. S., M. Chamaillard, et al. (2005). "Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract." Science **307**(5710): 731-4.
- Kobayashi, T., Y. Yamada, et al. (2007). "Regulation of Cav1.2 current: interaction with intracellular molecules." J Pharmacol Sci **103**(4): 347-53.
- Kobie, J. J., P. R. Shah, et al. (2006). "T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine." J Immunol **177**(10): 6780-6.
- Kohler, M., B. Hirschberg, et al. (1996). "Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain." Science **273**(5282): 1709-14.

- Kohler, R., R. Kreutz, et al. (2001). "Impaired function of endothelial pressure-activated cation channel in salt-sensitive genetic hypertension." J Am Soc Nephrol **12**(8): 1624-9.
- Kohler, R., H. Wulff, et al. (2003). "Blockade of the intermediate-conductance calcium-activated potassium channel as a new therapeutic strategy for restenosis." Circulation **108**(9): 1119-25.
- Komuro, H. and P. Rakic (1996). "Intracellular Ca²⁺ fluctuations modulate the rate of neuronal migration." Neuron **17**(2): 275-85.
- Kotturi, M. F., D. A. Carlow, et al. (2003). "Identification and functional characterization of voltage-dependent calcium channels in T lymphocytes." J Biol Chem **278**(47): 46949-60.
- Kraft, R., K. Benndorf, et al. (2000). "Large conductance Ca(2+)-activated K(+) channels in human meningioma cells." J Membr Biol **175**(1): 25-33.
- Kraft, R., P. Krause, et al. (2003). "BK channel openers inhibit migration of human glioma cells." Pflugers Arch **446**(2): 248-55.
- Krensky, A. M., A. Weiss, et al. (1990). "T-lymphocyte-antigen interactions in transplant rejection." N Engl J Med **322**(8): 510-7.
- Krug, A., A. Towarowski, et al. (2001). "Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12." Eur J Immunol **31**(10): 3026-37.
- Kursar, M., M. Koch, et al. (2007). "Cutting Edge: Regulatory T cells prevent efficient clearance of Mycobacterium tuberculosis." J Immunol **178**(5): 2661-5.
- Kyriakis, J. M. (1999). "Activation of the AP-1 transcription factor by inflammatory cytokines of the TNF family." Gene Expr **7**(4-6): 217-31.
- Lagaraine, C., C. Hoarau, et al. (2005). "Mycophenolic acid-treated human dendritic cells have a mature migratory phenotype and inhibit allogeneic responses via direct and indirect pathways." Int Immunol **17**(4): 351-63.
- Lagaraine, C., R. Lemoine, et al. (2008). "Induction of human CD4+ regulatory T cells by mycophenolic acid-treated dendritic cells." J Leukoc Biol **84**(4): 1057-64.
- Lakkis, F. G., A. Arakelov, et al. (2000). "Immunologic 'ignorance' of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue." Nat Med **6**(6): 686-8.
- Lancaster, B., R. A. Nicoll, et al. (1991). "Calcium activates two types of potassium channels in rat hippocampal neurons in culture." J Neurosci **11**(1): 23-30.
- Lang, F., G. L. Busch, et al. (1998). "Functional significance of cell volume regulatory mechanisms." Physiol Rev **78**(1): 247-306.
- Larsen, C. P., R. M. Steinman, et al. (1990). "Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants." J Exp Med **172**(5): 1483-93.
- Larsson, M., D. Messmer, et al. (2000). "Requirement of mature dendritic cells for efficient activation of influenza A-specific memory CD8+ T cells." J Immunol **165**(3): 1182-90.
- Launay, P., H. Cheng, et al. (2004). "TRPM4 regulates calcium oscillations after T cell activation." Science **306**(5700): 1374-7.
- Le Deist, F., C. Hivroz, et al. (1995). "A primary T-cell immunodeficiency associated with defective transmembrane calcium influx." Blood **85**(4): 1053-62.
- Le Fric, G., B. Laupeze, et al. (2003). "Soluble HLA-G inhibits human dendritic cell-triggered allogeneic T-cell proliferation without altering dendritic differentiation and maturation processes." Hum Immunol **64**(8): 752-61.
- Le Moine, A. and M. Goldman (2003). "Non-classical pathways of cell-mediated allograft rejection: new challenges for tolerance induction?" Am J Transplant **3**(2): 101-6.

- Lechler, R. I. and J. R. Batchelor (1982). "Immunogenicity of retransplanted rat kidney allografts. Effect of inducing chimerism in the first recipient and quantitative studies on immunosuppression of the second recipient." *J Exp Med* **156**(6): 1835-41.
- Lechler, R. I. and J. R. Batchelor (1982). "Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells." *J Exp Med* **155**(1): 31-41.
- Lechler, R. I., O. A. Garden, et al. (2003). "The complementary roles of deletion and regulation in transplantation tolerance." *Nat Rev Immunol* **3**(2): 147-58.
- Lee, A. W., T. Truong, et al. (2002). "A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy." *Vaccine* **20 Suppl 4**: A8-A22.
- Lee, G. K., H. J. Park, et al. (2002). "Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division." *Immunology* **107**(4): 452-60.
- Lee, J. I., R. W. Ganster, et al. (1999). "Cyclosporine A inhibits the expression of costimulatory molecules on in vitro-generated dendritic cells: association with reduced nuclear translocation of nuclear factor kappa B." *Transplantation* **68**(9): 1255-63.
- Lee, Y. R., I. H. Yang, et al. (2005). "Cyclosporin A and tacrolimus, but not rapamycin, inhibit MHC-restricted antigen presentation pathways in dendritic cells." *Blood* **105**(10): 3951-5.
- Lemoine, R., F. Velge-Roussel, et al. (2010). "Interferon gamma licensing of human dendritic cells in T helper-independent CD8+ alloimmunity." *Blood*.
- Lennert, K. and W. Remmele (1958). "[Karyometric research on lymph node cells in man. I. Germinoblasts, lymphoblasts & lymphocytes.]" *Acta Haematol* **19**(2): 99-113.
- Levings, M. K. and M. G. Roncarolo (2005). "Phenotypic and functional differences between human CD4+CD25+ and type 1 regulatory T cells." *Curr Top Microbiol Immunol* **293**: 303-26.
- Lew, D. P., T. Andersson, et al. (1985). "Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent phagocytosis in human neutrophils." *Nature* **315**(6019): 509-11.
- Liang, B., C. Workman, et al. (2008). "Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II." *J Immunol* **180**(9): 5916-26.
- Liang, S., V. Ristich, et al. (2008). "Modulation of dendritic cell differentiation by HLA-G and ILT4 requires the IL-6--STAT3 signaling pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(24): 8357-62.
- Lieberman, J. (2003). "The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal." *Nat Rev Immunol* **3**(5): 361-70.
- Lin, M. T., B. Storer, et al. (2003). "Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation." *N Engl J Med* **349**(23): 2201-10.
- Lin, M. T., B. Storer, et al. (2005). "Genetic variation in the IL-10 pathway modulates severity of acute graft-versus-host disease following hematopoietic cell transplantation: synergism between IL-10 genotype of patient and IL-10 receptor beta genotype of donor." *Blood* **106**(12): 3995-4001.
- Lindahl, K. F. and D. B. Wilson (1977). "Histocompatibility antigen-activated cytotoxic T lymphocytes. I. Estimates of the absolute frequency of killer cells generated in vitro." *J Exp Med* **145**(3): 500-7.
- Liou, J., M. Fivaz, et al. (2007). "Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca²⁺ store depletion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(22): 9301-6.

- Liou, J., M. L. Kim, et al. (2005). "STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx." Curr Biol **15**(13): 1235-41.
- Lioudyno, M. I., J. A. Kozak, et al. (2008). "Orai1 and STIM1 move to the immunological synapse and are up-regulated during T cell activation." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(6): 2011-6.
- Lis, A., C. Peinelt, et al. (2007). "CRACM1, CRACM2, and CRACM3 are store-operated Ca²⁺ channels with distinct functional properties." Curr Biol **17**(9): 794-800.
- Liu, Y. J., J. Xu, et al. (1997). "Follicular dendritic cells specifically express the long CR2/CD21 isoform." J Exp Med **185**(1): 165-70.
- Loser, K., J. Apelt, et al. (2007). "IL-10 controls ultraviolet-induced carcinogenesis in mice." J Immunol **179**(1): 365-71.
- Lotze, M. T. and K. J. Tracey (2005). "High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal." Nat Rev Immunol **5**(4): 331-42.
- Lu, L., W. C. Lee, et al. (1999). "Genetic engineering of dendritic cells to express immunosuppressive molecules (viral IL-10, TGF-beta, and CTLA4Ig)." J Leukoc Biol **66**(2): 293-6.
- Luik, R. M., M. M. Wu, et al. (2006). "The elementary unit of store-operated Ca²⁺ entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions." J Cell Biol **174**(6): 815-25.
- Lukacs-Kornek, V., D. Engel, et al. (2008). "The role of chemokines and their receptors in dendritic cell biology." Front Biosci **13**: 2238-52.
- Lunsford, K. E., P. H. Horne, et al. (2006). "Activation and maturation of alloreactive CD4-independent, CD8 cytolytic T cells." Am J Transplant **6**(10): 2268-81.
- MacLennan, D. H., W. J. Rice, et al. (1997). "The mechanism of Ca²⁺ transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases." J Biol Chem **272**(46): 28815-8.
- Mahnke, K., S. Ring, et al. (2007). "Induction of immunosuppressive functions of dendritic cells in vivo by CD4+CD25+ regulatory T cells: role of B7-H3 expression and antigen presentation." Eur J Immunol **37**(8): 2117-26.
- Manavalan, J. S., P. C. Rossi, et al. (2003). "High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells." Transpl Immunol **11**(3-4): 245-58.
- Marth, T., M. Zeitz, et al. (1999). "Extinction of IL-12 signaling promotes Fas-mediated apoptosis of antigen-specific T cells." J Immunol **162**(12): 7233-40.
- Martin, S. R. and P. M. Bayley (2002). "Regulatory implications of a novel mode of interaction of calmodulin with a double IQ-motif target sequence from murine dilute myosin V." Protein Sci **11**(12): 2909-23.
- Martinon, F. and J. Tschopp (2005). "NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens." Trends Immunol **26**(8): 447-54.
- Matasic, R., A. B. Dietz, et al. (2000). "Cyclooxygenase-independent inhibition of dendritic cell maturation by aspirin." Immunology **101**(1): 53-60.
- Matoba, T., H. Shimokawa, et al. (2000). "Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice." J Clin Invest **106**(12): 1521-30.
- Matzner, N., I. M. Zemtsova, et al. (2008). "Ion channels modulating mouse dendritic cell functions." J Immunol **181**(10): 6803-9.
- McColl, S. R. (2002). "Chemokines and dendritic cells: a crucial alliance." Immunol Cell Biol **80**(5): 489-96.
- McDonald, S. P. and G. R. Russ (2002). "Associations between use of cyclosporine-sparing agents and outcome in kidney transplant recipients." Kidney Int **61**(6): 2259-65.
- McKenna, K., A. S. Beignon, et al. (2005). "Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity." J Virol **79**(1): 17-27.

- Medzhitov, R. (2001). "Toll-like receptors and innate immunity." Nat Rev Immunol **1**(2): 135-45.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, et al. (1997). "A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity." Nature **388**(6640): 394-7.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, et al. (1998). "MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways." Mol Cell **2**(2): 253-8.
- Mehling, A., S. Grabbe, et al. (2000). "Mycophenolate mofetil impairs the maturation and function of murine dendritic cells." J Immunol **165**(5): 2374-81.
- Mele, T. S. and P. F. Halloran (2000). "The use of mycophenolate mofetil in transplant recipients." Immunopharmacology **47**(2-3): 215-45.
- Melero, I., N. Bach, et al. (1997). "Costimulation, tolerance and ignorance of cytolytic T lymphocytes in immune responses to tumor antigens." Life Sci **60**(23): 2035-41.
- Mellor, A. L. and D. H. Munn (2004). "IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism." Nat Rev Immunol **4**(10): 762-74.
- Messmer, D., H. Yang, et al. (2004). "High mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization." J Immunol **173**(1): 307-13.
- Miller, J. F. and W. R. Heath (1993). "Self-ignorance in the peripheral T-cell pool." Immunol Rev **133**: 131-50.
- Misra, N., J. Bayry, et al. (2004). "Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells." J Immunol **172**(8): 4676-80.
- Mitchison, T. J. and L. P. Cramer (1996). "Actin-based cell motility and cell locomotion." Cell **84**(3): 371-9.
- Mizumoto, N. and A. Takashima (2004). "CD1a and langerin: acting as more than Langerhans cell markers." J Clin Invest **113**(5): 658-60.
- Montell, C. and G. M. Rubin (1989). "Molecular characterization of the Drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction." Neuron **2**(4): 1313-23.
- Monti, P., A. Mercalli, et al. (2003). "Rapamycin impairs antigen uptake of human dendritic cells." Transplantation **75**(1): 137-45.
- Morelli, A. E. and A. W. Thomson (2003). "Dendritic cells: regulators of alloimmunity and opportunities for tolerance induction." Immunol Rev **196**: 125-46.
- Morelli, A. E. and A. W. Thomson (2007). "Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance." Nat Rev Immunol **7**(8): 610-21.
- Morelon, E., M. F. Mamzer-Bruneel, et al. (2001). "Sirolimus: a new promising immunosuppressive drug. Towards a rationale for its use in renal transplantation." Nephrol Dial Transplant **16**(1): 18-20.
- Morgano, A., I. Pierri, et al. (1990). "Decreased lymphocyte blastogenesis, IL2 production and NK activity following nifedipine administration to healthy humans." Eur J Clin Pharmacol **39**(6): 545-50.
- Morita, T., A. Tanimura, et al. (2009). "A Stim1-dependent, noncapacitative Ca²⁺-entry pathway is activated by B-cell-receptor stimulation and depletion of Ca²⁺." J Cell Sci **122**(Pt 8): 1220-8.
- Moseman, E. A., X. Liang, et al. (2004). "Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells." J Immunol **173**(7): 4433-42.
- Motiani, R. K., I. F. Abdullaev, et al. (2010). "A novel native store-operated calcium channel encoded by Orai3: selective requirement of Orai3 versus Orai1 in estrogen receptor-positive versus estrogen receptor-negative breast cancer cells." J Biol Chem **285**(25): 19173-83.

- Muik, M., I. Frischauf, et al. (2008). "Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of ORAI1 with STIM1 mediates ORAI1 channel activation." J Biol Chem **283**(12): 8014-22.
- Munn, D. H., M. D. Sharma, et al. (2002). "Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase." Science **297**(5588): 1867-70.
- Nakahara, T., Y. Moroi, et al. (2006). "Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement." J Dermatol Sci **42**(1): 1-11.
- Nakahara, T., H. Uchi, et al. (2004). "Role of c-Jun N-terminal kinase on lipopolysaccharide induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells." Int Immunol **16**(12): 1701-9.
- Nakamura, K., A. Kitani, et al. (2001). "Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta." J Exp Med **194**(5): 629-44.
- Navedo, M. F., G. C. Amberg, et al. (2005). "Constitutively active L-type Ca²⁺ channels." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(31): 11112-7.
- Negulescu, P. A., N. Shastri, et al. (1994). "Intracellular calcium dependence of gene expression in single T lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(7): 2873-7.
- Newell, K. A., G. He, et al. (1999). "Cutting edge: blockade of the CD28/B7 costimulatory pathway inhibits intestinal allograft rejection mediated by CD4+ but not CD8+ T cells." J Immunol **163**(5): 2358-62.
- Ng, W. F., P. J. Duggan, et al. (2001). "Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells." Blood **98**(9): 2736-44.
- Nimmerjahn, F. and J. V. Ravetch (2008). "Fcγ receptors as regulators of immune responses." Nat Rev Immunol **8**(1): 34-47.
- Nishizuka, Y. and T. Sakakura (1969). "Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice." Science **166**(906): 753-5.
- Nolan, K. F., V. Strong, et al. (2004). "IL-10-conditioned dendritic cells, decommissioned for recruitment of adaptive immunity, elicit innate inflammatory gene products in response to danger signals." J Immunol **172**(4): 2201-9.
- O'Connell, P. J., V. A. Klyachko, et al. (2002). "Identification of functional type 1 ryanodine receptors in mouse dendritic cells." FEBS Lett **512**(1-3): 67-70.
- Oderup, C., L. Cederbom, et al. (2006). "Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression." Immunology **118**(2): 240-9.
- Ogura, Y., N. Inohara, et al. (2001). "Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-κB." J Biol Chem **276**(7): 4812-8.
- Ohashi, P. S., S. Oehen, et al. (1991). "Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice." Cell **65**(2): 305-17.
- Oh-Hora, M., M. Yamashita, et al. (2008). "Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance." Nat Immunol **9**(4): 432-43.
- Onishi, Y., Z. Fehervari, et al. (2008). "Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(29): 10113-8.
- Opitz, B., A. Puschel, et al. (2006). "Listeria monocytogenes activated p38 MAPK and induced IL-8 secretion in a nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent manner in endothelial cells." J Immunol **176**(1): 484-90.
- Ouadid-Ahidouch, H., M. Roudbaraki, et al. (2004). "Cell-cycle-dependent expression of the large Ca²⁺-activated K⁺ channels in breast cancer cells." Biochem Biophys Res Commun **316**(1): 244-51.

- Ouadid-Ahidouch, H., M. Roudbaraki, et al. (2004). "Functional and molecular identification of intermediate-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels in breast cancer cells: association with cell cycle progression." *Am J Physiol Cell Physiol* **287**(1): C125-34.
- Pandiyan, P., L. Zheng, et al. (2007). "CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells." *Nat Immunol* **8**(12): 1353-62.
- Papiernik, M. and A. Banz (2001). "Natural regulatory CD4 T cells expressing CD25." *Microbes Infect* **3**(11): 937-45.
- Papiernik, M., M. L. de Moraes, et al. (1998). "Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency." *Int Immunol* **10**(4): 371-8.
- Paradies, G., G. Petrosillo, et al. (2009). "Role of cardiolipin peroxidation and Ca²⁺ in mitochondrial dysfunction and disease." *Cell Calcium* **45**(6): 643-50.
- Parekh, A. B. and R. Penner (1997). "Store depletion and calcium influx." *Physiol Rev* **77**(4): 901-30.
- Park, Y. B. (1994). "Ion selectivity and gating of small conductance Ca(2+)-activated K+ channels in cultured rat adrenal chromaffin cells." *J Physiol* **481** (Pt 3): 555-70.
- Partida-Sanchez, S., S. Goodrich, et al. (2004). "Regulation of dendritic cell trafficking by the ADP-ribosyl cyclase CD38: impact on the development of humoral immunity." *Immunity* **20**(3): 279-91.
- Partiseti, M., F. Le Deist, et al. (1994). "The calcium current activated by T cell receptor and store depletion in human lymphocytes is absent in a primary immunodeficiency." *J Biol Chem* **269**(51): 32327-35.
- Pedersen, A. E., M. Gad, et al. (2004). "Induction of regulatory dendritic cells by dexamethasone and 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D(3)." *Immunol Lett* **91**(1): 63-9.
- Pelegri, P. and A. Surprenant (2009). "The P2X(7) receptor-pannexin connection to dye uptake and IL-1beta release." *Purinergic Signal* **5**(2): 129-37.
- Penna, A., A. Demuro, et al. (2008). "The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers." *Nature* **456**(7218): 116-20.
- Penna, G. and L. Adorini (2000). "1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation." *J Immunol* **164**(5): 2405-11.
- Pennington, M. W., C. Beeton, et al. (2009). "Engineering a stable and selective peptide blocker of the Kv1.3 channel in T lymphocytes." *Mol Pharmacol* **75**(4): 762-73.
- Pettit, E. J. and F. S. Fay (1998). "Cytosolic free calcium and the cytoskeleton in the control of leukocyte chemotaxis." *Physiol Rev* **78**(4): 949-67.
- Philipp, S., B. Strauss, et al. (2003). "TRPC3 mediates T-cell receptor-dependent calcium entry in human T-lymphocytes." *J Biol Chem* **278**(29): 26629-38.
- Picard, C., C. A. McCarl, et al. (2009). "STIM1 mutation associated with a syndrome of immunodeficiency and autoimmunity." *N Engl J Med* **360**(19): 1971-80.
- Piccirillo, C. A., J. J. Letterio, et al. (2002). "CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness." *J Exp Med* **196**(2): 237-46.
- Pigozzi, D., T. Ducret, et al. (2006). "Calcium store contents control the expression of TRPC1, TRPC3 and TRPV6 proteins in LNCaP prostate cancer cell line." *Cell Calcium* **39**(5): 401-15.
- Pipkin, M. E. and J. Lieberman (2007). "Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works." *Curr Opin Immunol* **19**(3): 301-8.

- Poggi, A., A. Rubartelli, et al. (1998). "Involvement of dihydropyridine-sensitive calcium channels in human dendritic cell function. Competition by HIV-1 Tat." J Biol Chem **273**(13): 7205-9.
- Poltorak, A., X. He, et al. (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." Science **282**(5396): 2085-8.
- Popov, I. A., E. V. Fedoseyeva, et al. (1995). "Direct evidence for in vivo induction of CD8+ cytotoxic T cells directed to donor MHC class I peptides following mouse allotransplantation." Transplantation **60**(12): 1621-4.
- Potier, M., V. Joulin, et al. (2006). "Identification of SK3 channel as a new mediator of breast cancer cell migration." Mol Cancer Ther **5**(11): 2946-53.
- Prakriya, M., S. Feske, et al. (2006). "Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel." Nature **443**(7108): 230-3.
- Prickett, T. C., J. L. McKenzie, et al. (1988). "Characterization of interstitial dendritic cells in human liver." Transplantation **46**(5): 754-61.
- Puccetti, P. and U. Grohmann (2007). "IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation." Nat Rev Immunol **7**(10): 817-23.
- Pulendran, B. (2004). "Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors." Immunol Rev **199**: 227-50.
- Putney, J. W., Jr. (1986). "A model for receptor-regulated calcium entry." Cell Calcium **7**(1): 1-12.
- Putney, J. W., Jr. (2004). "The enigmatic TRPCs: multifunctional cation channels." Trends Cell Biol **14**(6): 282-6.
- Putney, J. W., Jr. (2005). "Capacitative calcium entry: sensing the calcium stores." J Cell Biol **169**(3): 381-2.
- Quezada, S. A., L. Z. Jarvinen, et al. (2004). "CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity." Annu Rev Immunol **22**: 307-28.
- Rae, J., K. Cooper, et al. (1991). "Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B." J Neurosci Methods **37**(1): 15-26.
- Randolph, G. J. (2001). "Dendritic cell migration to lymph nodes: cytokines, chemokines, and lipid mediators." Semin Immunol **13**(5): 267-74.
- Randolph, G. J., J. Ochando, et al. (2008). "Migration of dendritic cell subsets and their precursors." Annu Rev Immunol **26**: 293-316.
- Rangaraju, S., V. Chi, et al. (2009). "Kv1.3 potassium channels as a therapeutic target in multiple sclerosis." Expert Opin Ther Targets **13**(8): 909-24.
- Ransom, C. B. and H. Sontheimer (2001). "BK channels in human glioma cells." J Neurophysiol **85**(2): 790-803.
- Ratzinger, G., P. Stoitzner, et al. (2002). "Matrix metalloproteinases 9 and 2 are necessary for the migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells from human and murine skin." J Immunol **168**(9): 4361-71.
- Reetz, G. and G. Reiser (1996). "[Ca²⁺]_i oscillations induced by bradykinin in rat glioma cells associated with Ca²⁺ store-dependent Ca²⁺ influx are controlled by cell volume and by membrane potential." Cell Calcium **19**(2): 143-56.
- Reis e Sousa, C., A. D. Edwards, et al. (2001). "Conditioning of dendritic cells by pathogen-derived stimuli." Immunobiology **204**(5): 595-7.
- Ren, X., F. Ye, et al. (2007). "Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells." Cell Death Differ **14**(12): 2076-84.
- Rescigno, M., M. Martino, et al. (1998). "Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways." J Exp Med **188**(11): 2175-80.

- Richards, D. M., S. L. Dalheimer, et al. (2004). "Indirect minor histocompatibility antigen presentation by allograft recipient cells in the draining lymph node leads to the activation and clonal expansion of CD4+ T cells that cause obliterative airways disease." *J Immunol* **172**(6): 3469-79.
- Ridley, A. J., M. A. Schwartz, et al. (2003). "Cell migration: integrating signals from front to back." *Science* **302**(5651): 1704-9.
- Ringer, S. (1883). "A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart." *J Physiol* **4**(1): 29-42 3.
- Ringer, S. (1883). "A third contribution regarding the Influence of the Inorganic Constituents of the Blood on the Ventricular Contraction." *J Physiol* **4**(2-3): 222-5.
- Rock, K. L., A. Hearn, et al. (2005). "Natural endogenous adjuvants." *Springer Semin Immunopathol* **26**(3): 231-46.
- Roger, S., M. Potier, et al. (2004). "Description and role in proliferation of iberiotoxin-sensitive currents in different human mammary epithelial normal and cancerous cells." *Biochim Biophys Acta* **1667**(2): 190-9.
- Rogers, N. C., E. C. Slack, et al. (2005). "Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins." *Immunity* **22**(4): 507-17.
- Roncarolo, M. G., M. K. Levings, et al. (2001). "Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells." *J Exp Med* **193**(2): F5-9.
- Roos, J., P. J. DiGregorio, et al. (2005). "STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function." *J Cell Biol* **169**(3): 435-45.
- Rossi, M. and J. W. Young (2005). "Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity." *J Immunol* **175**(3): 1373-81.
- Roth, E., J. Schwartzkopff, et al. (2002). "CD40 ligation in the presence of self-reactive CD8 T cells leads to severe immunopathology." *J Immunol* **168**(10): 5124-9.
- Rothenfusser, S., E. Tuma, et al. (2002). "Plasmacytoid dendritic cells: the key to CpG." *Hum Immunol* **63**(12): 1111-9.
- Rouse, B. T. (2007). "Regulatory T cells in health and disease." *J Intern Med* **262**(1): 78-95.
- Sabers, C. J., M. M. Martin, et al. (1995). "Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells." *J Biol Chem* **270**(2): 815-22.
- Sadighi Akha, A. A., N. J. Willmott, et al. (1996). "Anti-Ig-induced calcium influx in rat B lymphocytes mediated by cGMP through a dihydropyridine-sensitive channel." *J Biol Chem* **271**(13): 7297-300.
- Saito, M., R. Sato, et al. (1996). "RANTES and platelet-activating factor open Ca²⁺-activated K⁺ channels in eosinophils." *Faseb J* **10**(7): 792-8.
- Sakaguchi, S. (2004). "Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses." *Annu Rev Immunol* **22**: 531-62.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, et al. (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." *J Immunol* **155**(3): 1151-64.
- Sakaguchi, S., K. Wing, et al. (2007). "Regulatory T cells - a brief history and perspective." *Eur J Immunol* **37 Suppl 1**: S116-23.
- Sallusto, F., M. Cella, et al. (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**(2): 389-400.
- Sallusto, F. and A. Lanzavecchia (1994). "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-

- stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha." *J Exp Med* **179**(4): 1109-18.
- Sallusto, F., D. Lenig, et al. (1998). "Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes." *J Exp Med* **187**(6): 875-83.
- Sandow, S. L., M. Tare, et al. (2002). "Involvement of myoendothelial gap junctions in the actions of endothelium-derived hyperpolarizing factor." *Circ Res* **90**(10): 1108-13.
- Santodonato, L., G. D'Agostino, et al. (2003). "Monocyte-derived dendritic cells generated after a short-term culture with IFN-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulate a potent Epstein-Barr virus-specific CD8+ T cell response." *J Immunol* **170**(10): 5195-202.
- Sarris, M., K. G. Andersen, et al. (2008). "Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition." *Immunity* **28**(3): 402-13.
- Sato, K. and S. Fujita (2007). "Dendritic cells: nature and classification." *Allergol Int* **56**(3): 183-91.
- Sato, S., A. S. Miller, et al. (1996). "CD22 is both a positive and negative regulator of B lymphocyte antigen receptor signal transduction: altered signaling in CD22-deficient mice." *Immunity* **5**(6): 551-62.
- Savignac, M., A. Badou, et al. (2001). "Protein kinase C-mediated calcium entry dependent upon dihydropyridine sensitive channels: a T cell receptor-coupled signaling pathway involved in IL-4 synthesis." *Faseb J* **15**(9): 1577-9.
- Savignac, M., B. Gomes, et al. (2004). "Dihydropyridine receptors are selective markers of Th2 cells and can be targeted to prevent Th2-dependent immunopathological disorders." *J Immunol* **172**(9): 5206-12.
- Sawyer, G. J., R. Dalchau, et al. (1993). "Indirect T cell allorecognition: a cyclosporin A resistant pathway for T cell help for antibody production to donor MHC antigens." *Transpl Immunol* **1**(1): 77-81.
- Sayegh, M. H., N. Perico, et al. (1994). "Mechanisms of acquired thymic unresponsiveness to renal allografts. Thymic recognition of immunodominant allo-MHC peptides induces peripheral T cell anergy." *Transplantation* **58**(2): 125-32.
- Scharenberg, A. M., L. A. Humphries, et al. (2007). "Calcium signalling and cell-fate choice in B cells." *Nat Rev Immunol* **7**(10): 778-89.
- Schwab, A., J. Reinhardt, et al. (1999). "K(+) channel-dependent migration of fibroblasts and human melanoma cells." *Cell Physiol Biochem* **9**(3): 126-32.
- Schwab, A., B. Schuricht, et al. (1999). "Migration of transformed renal epithelial cells is regulated by K+ channel modulation of actin cytoskeleton and cell volume." *Pflugers Arch* **438**(3): 330-7.
- Schwab, A., L. Wojnowski, et al. (1994). "Oscillating activity of a Ca(2+)-sensitive K+ channel. A prerequisite for migration of transformed Madin-Darby canine kidney focus cells." *J Clin Invest* **93**(4): 1631-6.
- Schwab, A., A. Wulf, et al. (2006). "Subcellular distribution of calcium-sensitive potassium channels (IK1) in migrating cells." *J Cell Physiol* **206**(1): 86-94.
- Schwartz, R. and W. Dameshek (1959). "Drug-induced immunological tolerance." *Nature* **183**(4676): 1682-3.
- Schwartz, R. H. (1990). "A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy." *Science* **248**(4961): 1349-56.
- Schwartz, R. H. (2003). "T cell anergy." *Annu Rev Immunol* **21**: 305-34.
- Seong, S. Y. and P. Matzinger (2004). "Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses." *Nat Rev Immunol* **4**(6): 469-78.

- Seya, T., K. Funami, et al. (2005). "Antibodies against human Toll-like receptors (TLRs): TLR distribution and localization in human dendritic cells." J Endotoxin Res **11**(6): 369-74.
- Shedlock, D. J., J. K. Whitmire, et al. (2003). "Role of CD4 T cell help and costimulation in CD8 T cell responses during *Listeria monocytogenes* infection." J Immunol **170**(4): 2053-63.
- Shen, L. and K. L. Rock (2006). "Priming of T cells by exogenous antigen cross-presented on MHC class I molecules." Curr Opin Immunol **18**(1): 85-91.
- Shevach, E. M. (2006). "From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells." Immunity **25**(2): 195-201.
- Shi, G. X., K. Harrison, et al. (2004). "Toll-like receptor signaling alters the expression of regulator of G protein signaling proteins in dendritic cells: implications for G protein-coupled receptor signaling." J Immunol **172**(9): 5175-84.
- Shibasaki, F., U. Hallin, et al. (2002). "Calcineurin as a multifunctional regulator." J Biochem **131**(1): 1-15.
- Shimizu, J., S. Yamazaki, et al. (2002). "Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance." Nat Immunol **3**(2): 135-42.
- Shimizu, K., S. Fujii, et al. (2000). "Tacrolimus (FK506) treatment of CD34+ hematopoietic progenitor cells promote the development of dendritic cells that drive CD4+ T cells toward Th2 responses." J Leukoc Biol **68**(5): 633-40.
- Shortman, K. and Y. J. Liu (2002). "Mouse and human dendritic cell subtypes." Nat Rev Immunol **2**(3): 151-61.
- Shortman, K. and S. H. Naik (2007). "Steady-state and inflammatory dendritic-cell development." Nat Rev Immunol **7**(1): 19-30.
- Shortman, K., D. Vremec, et al. (1998). "The linkage between T-cell and dendritic cell development in the mouse thymus." Immunol Rev **165**: 39-46.
- Siegal, F. P., N. Kadowaki, et al. (1999). "The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood." Science **284**(5421): 1835-7.
- Singer, G. G., A. C. Carrera, et al. (1994). "Apoptosis, Fas and systemic autoimmunity: the MRL-lpr/lpr model." Curr Opin Immunol **6**(6): 913-20.
- Smyth, J. T., W. I. DeHaven, et al. (2007). "Role of the microtubule cytoskeleton in the function of the store-operated Ca²⁺ channel activator STIM1." J Cell Sci **120**(Pt 21): 3762-71.
- Sordi, V., G. Bianchi, et al. (2006). "Differential effects of immunosuppressive drugs on chemokine receptor CCR7 in human monocyte-derived dendritic cells: selective upregulation by rapamycin." Transplantation **82**(6): 826-34.
- Sotomayor, E. M., I. Borrello, et al. (1999). "Conversion of tumor-specific CD4+ T-cell tolerance to T-cell priming through in vivo ligation of CD40." Nat Med **5**(7): 780-7.
- Sozzani, S. (2005). "Dendritic cell trafficking: more than just chemokines." Cytokine Growth Factor Rev **16**(6): 581-92.
- Sprent, J. and H. Kishimoto (2002). "The thymus and negative selection." Immunol Rev **185**: 126-35.
- Sprent, J. and S. R. Webb (1995). "Intrathymic and extrathymic clonal deletion of T cells." Curr Opin Immunol **7**(2): 196-205.
- Srikanth, S., H. J. Jung, et al. (2010). "A novel EF-hand protein, CRACR2A, is a cytosolic Ca²⁺ sensor that stabilizes CRAC channels in T cells." Nat Cell Biol **12**(5): 436-46.
- Srivastava, P. K. and R. G. Maki (1991). "Stress-induced proteins in immune response to cancer." Curr Top Microbiol Immunol **167**: 109-23.

- Stathopoulos, P. B., L. Zheng, et al. (2009). "Stromal interaction molecule (STIM) 1 and STIM2 calcium sensing regions exhibit distinct unfolding and oligomerization kinetics." *J Biol Chem* **284**(2): 728-32.
- Stathopoulos, P. B., L. Zheng, et al. (2008). "Structural and mechanistic insights into STIM1-mediated initiation of store-operated calcium entry." *Cell* **135**(1): 110-22.
- Steinbrink, K., E. Graulich, et al. (2002). "CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity." *Blood* **99**(7): 2468-76.
- Steinman, R. M. (1991). "The dendritic cell system and its role in immunogenicity." *Annu Rev Immunol* **9**: 271-96.
- Steinman, R. M. and Z. A. Cohn (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." *J Exp Med* **137**(5): 1142-62.
- Steinmuller, D. (1985). "Which T cells mediate allograft rejection?" *Transplantation* **40**(3): 229-33.
- Steinschulte, C., T. Taner, et al. (2003). "Cutting edge: sanglifehrin A, a novel cyclophilin-binding immunosuppressant blocks bioactive IL-12 production by human dendritic cells." *J Immunol* **171**(2): 542-6.
- Stephens, L. A., C. Mottet, et al. (2001). "Human CD4(+)CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro." *Eur J Immunol* **31**(4): 1247-54.
- Stocker, M. (2004). "Ca(2+)-activated K⁺ channels: molecular determinants and function of the SK family." *Nat Rev Neurosci* **5**(10): 758-70.
- Stohlman, S. A., C. C. Bergmann, et al. (1998). "CTL effector function within the central nervous system requires CD4⁺ T cells." *J Immunol* **160**(6): 2896-904.
- Stoitzner, P., S. Holzmann, et al. (2003). "Visualization and characterization of migratory Langerhans cells in murine skin and lymph nodes by antibodies against Langerin/CD207." *J Invest Dermatol* **120**(2): 266-74.
- Stokes, L., J. Gordon, et al. (2004). "Non-voltage-gated L-type Ca²⁺ channels in human T cells: pharmacology and molecular characterization of the major alpha pore-forming and auxiliary beta-subunits." *J Biol Chem* **279**(19): 19566-73.
- Strauss, L., C. Bergmann, et al. (2007). "A unique subset of CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment." *Clin Cancer Res* **13**(15 Pt 1): 4345-54.
- Strobl, H. and W. Knapp (1999). "TGF-beta1 regulation of dendritic cells." *Microbes Infect* **1**(15): 1283-90.
- Suchin, E. J., P. B. Langmuir, et al. (2001). "Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question." *J Immunol* **166**(2): 973-81.
- Suciu-Foca, N., E. Reed, et al. (1991). "The role of anti-HLA antibodies in heart transplantation." *Transplantation* **51**(3): 716-24.
- Sullivan, K. E., D. McDonald-McGinn, et al. (2002). "CD4(+) CD25(+) T-cell production in healthy humans and in patients with thymic hypoplasia." *Clin Diagn Lab Immunol* **9**(5): 1129-31.
- Sun, W., Q. Wang, et al. (2003). "Blockade of CD40 pathway enhances the induction of immune tolerance by immature dendritic cells genetically modified to express cytotoxic T lymphocyte antigen 4 immunoglobulin." *Transplantation* **76**(9): 1351-9.
- Suri-Payer, E., A. Z. Amar, et al. (1998). "CD4⁺CD25⁺ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells." *J Immunol* **160**(3): 1212-8.
- Sutmuller, R. P., M. H. den Brok, et al. (2006). "Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells." *J Clin Invest* **116**(2): 485-94.

- Swanson, J. A. and C. Watts (1995). "Macropinocytosis." Trends Cell Biol **5**(11): 424-8.
- Taams, L. S. and A. N. Akbar (2005). "Peripheral generation and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." Curr Top Microbiol Immunol **293**: 115-31.
- Taams, L. S., W. van Eden, et al. (1999). "Antigen presentation by T cells versus professional antigen-presenting cells (APC): differential consequences for T cell activation and subsequent T cell-APC interactions." Eur J Immunol **29**(5): 1543-50.
- Tada, H., S. Aiba, et al. (2005). "Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells." Infect Immun **73**(12): 7967-76.
- Tadokoro, C. E., G. Shakhar, et al. (2006). "Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo." J Exp Med **203**(3): 505-11.
- Takahashi, T., Y. Kuniyasu, et al. (1998). "Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state." Int Immunol **10**(12): 1969-80.
- Takeda, K. and S. Akira (2005). "Toll-like receptors in innate immunity." Int Immunol **17**(1): 1-14.
- Takeda, K., T. Kaisho, et al. (2003). "Toll-like receptors." Annu Rev Immunol **21**: 335-76.
- Tan, P. H., P. Sagoo, et al. (2005). "Inhibition of NF-kappa B and oxidative pathways in human dendritic cells by antioxidative vitamins generates regulatory T cells." J Immunol **174**(12): 7633-44.
- Taner, T., H. Hackstein, et al. (2005). "Rapamycin-treated, alloantigen-pulsed host dendritic cells induce ag-specific T cell regulation and prolong graft survival." Am J Transplant **5**(2): 228-36.
- Tang, A., M. Amagai, et al. (1993). "Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin." Nature **361**(6407): 82-5.
- Tang, X., I. Maricic, et al. (2006). "Regulation of immunity by a novel population of Qa-1-restricted CD8alphaalpha+TCRalphabeta+ T cells." J Immunol **177**(11): 7645-55.
- Tao, R., C. P. Lau, et al. (2008). "Regulation of cell proliferation by intermediate-conductance Ca2+-activated potassium and volume-sensitive chloride channels in mouse mesenchymal stem cells." Am J Physiol Cell Physiol **295**(5): C1409-16.
- Taylor, A. L., C. J. Watson, et al. (2005). "Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy." Crit Rev Oncol Hematol **56**(1): 23-46.
- Taylor, M. S., A. D. Bonev, et al. (2003). "Altered expression of small-conductance Ca2+-activated K+ (SK3) channels modulates arterial tone and blood pressure." Circ Res **93**(2): 124-31.
- Terada, N., J. J. Lucas, et al. (1993). "Rapamycin blocks cell cycle progression of activated T cells prior to events characteristic of the middle to late G1 phase of the cycle." J Cell Physiol **154**(1): 7-15.
- Thery, C., L. Duban, et al. (2002). "Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes." Nat Immunol **3**(12): 1156-62.
- Thomas, J. M., J. L. Contreras, et al. (1999). "Peritransplant tolerance induction in macaques: early events reflecting the unique synergy between immunotoxin and deoxyspergualin." Transplantation **68**(11): 1660-73.
- Thompson, J. and T. Begenisich (2009). "Mechanistic details of BK channel inhibition by the intermediate conductance, Ca2+-activated K channel." Channels (Austin) **3**(3): 194-204.
- Thomson, A. W., H. R. Turnquist, et al. (2009). "Immunoregulatory functions of mTOR inhibition." Nat Rev Immunol **9**(5): 324-37.

- Thornton, A. M. and E. M. Shevach (1998). "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production." J Exp Med **188**(2): 287-96.
- Thyagarajan, B., V. Lukacs, et al. (2008). "Hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate mediates calcium-induced inactivation of TRPV6 channels." J Biol Chem **283**(22): 14980-7.
- Toro, L., M. Wallner, et al. (1998). "Maxi-K(Ca), a Unique Member of the Voltage-Gated K Channel Superfamily." News Physiol Sci **13**: 112-117.
- Toyama, K., H. Wulff, et al. (2008). "The intermediate-conductance calcium-activated potassium channel KCa3.1 contributes to atherogenesis in mice and humans." J Clin Invest **118**(9): 3025-37.
- Trambley, J., A. W. Bingaman, et al. (1999). "Asialo GM1(+) CD8(+) T cells play a critical role in costimulation blockade-resistant allograft rejection." J Clin Invest **104**(12): 1715-22.
- Turnquist, H. R., G. Raimondi, et al. (2007). "Rapamycin-conditioned dendritic cells are poor stimulators of allogeneic CD4+ T cells, but enrich for antigen-specific Foxp3+ T regulatory cells and promote organ transplant tolerance." J Immunol **178**(11): 7018-31.
- Uemura, Y., T. Y. Liu, et al. (2007). "Identification of functional type 1 ryanodine receptors in human dendritic cells." Biochem Biophys Res Commun **362**(2): 510-5.
- Vacca, C., F. Fallarino, et al. (2005). "CD40 ligation prevents onset of tolerogenic properties in human dendritic cells treated with CTLA-4-Ig." Microbes Infect **7**(7-8): 1040-8.
- Vakkila, J., R. A. Demarco, et al. (2008). "Coordinate NF-kappaB and STAT1 activation promotes development of myeloid type 1 dendritic cells." Scand J Immunol **67**(3): 260-9.
- Valera, I., N. Fernandez, et al. (2008). "Costimulation of dectin-1 and DC-SIGN triggers the arachidonic acid cascade in human monocyte-derived dendritic cells." J Immunol **180**(8): 5727-36.
- van Gisbergen, K. P., M. Sanchez-Hernandez, et al. (2005). "Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN." J Exp Med **201**(8): 1281-92.
- van Kooten, C. and J. Banchereau (2000). "CD40-CD40 ligand." J Leukoc Biol **67**(1): 2-17.
- van Nierop, K. and C. de Groot (2002). "Human follicular dendritic cells: function, origin and development." Semin Immunol **14**(4): 251-7.
- Vanbervliet, B., B. Homey, et al. (2002). "Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces." Eur J Immunol **32**(1): 231-42.
- VanBuskirk, A. M., W. J. Burlingham, et al. (2000). "Human allograft acceptance is associated with immune regulation." J Clin Invest **106**(1): 145-55.
- Varnai, P., L. Hunyady, et al. (2009). "STIM and Orai: the long-awaited constituents of store-operated calcium entry." Trends Pharmacol Sci **30**(3): 118-28.
- Vassiliou, E., H. Jing, et al. (2003). "Prostaglandin E2 inhibits TNF production in murine bone marrow-derived dendritic cells." Cell Immunol **223**(2): 120-32.
- Veldhoen, M., H. Moncrieffe, et al. (2006). "Modulation of dendritic cell function by naive and regulatory CD4+ T cells." J Immunol **176**(10): 6202-10.
- Venkatachalam, K. and C. Montell (2007). "TRP channels." Annu Rev Biochem **76**: 387-417.
- Viala, J., C. Chaput, et al. (2004). "Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the Helicobacter pylori cag pathogenicity island." Nat Immunol **5**(11): 1166-74.

- Vieira, P. L., J. R. Christensen, et al. (2004). "IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells." *J Immunol* **172**(10): 5986-93.
- Vig, M., A. Beck, et al. (2006). "CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel." *Curr Biol* **16**(20): 2073-9.
- Vig, M., W. I. DeHaven, et al. (2008). "Defective mast cell effector functions in mice lacking the CRACM1 pore subunit of store-operated calcium release-activated calcium channels." *Nat Immunol* **9**(1): 89-96.
- Vig, M. and J. P. Kinet (2007). "The long and arduous road to CRAC." *Cell Calcium* **42**(2): 157-62.
- Vig, M. and J. P. Kinet (2009). "Calcium signaling in immune cells." *Nat Immunol* **10**(1): 21-7.
- Vignali, D. A., L. W. Collison, et al. (2008). "How regulatory T cells work." *Nat Rev Immunol* **8**(7): 523-32.
- von Herrath, M. G., M. Yokoyama, et al. (1996). "CD4-deficient mice have reduced levels of memory cytotoxic T lymphocytes after immunization and show diminished resistance to subsequent virus challenge." *J Virol* **70**(2): 1072-9.
- Vu, M. D., F. Amanullah, et al. (2004). "Different costimulatory and growth factor requirements for CD4+ and CD8+ T cell-mediated rejection." *J Immunol* **173**(1): 214-21.
- Vyas, J. M., A. G. Van der Veen, et al. (2008). "The known unknowns of antigen processing and presentation." *Nat Rev Immunol* **8**(8): 607-18.
- Wadia, P. P., N. D. Herrera, et al. (2009). "Mycophenolic acid inhibits maturation and function of human dendritic cells and B cells." *Hum Immunol* **70**(9): 692-700.
- Wagner, K. and H. H. Neumayer (1987). "Influence of the calcium antagonist diltiazem on delayed graft function in cadaveric kidney transplantation: results of a 6-month follow-up." *Transplant Proc* **19**(1 Pt 2): 1353-7.
- Walker, L. S., A. Chodos, et al. (2003). "Antigen-dependent proliferation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo." *J Exp Med* **198**(2): 249-58.
- Walker, M. R., B. D. Carson, et al. (2005). "De novo generation of antigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells from human CD4+CD25- cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(11): 4103-8.
- Walker, M. R. and M. D. Mannie (2002). "Acquisition of functional MHC class II/peptide complexes by T cells during thymic development and CNS-directed pathogenesis." *Cell Immunol* **218**(1-2): 13-25.
- Wang, X. N., L. Sviland, et al. (1998). "Cellular alloreactivity of human cord blood cells detected by T-cell frequency analysis and a human skin explant model." *Transplantation* **66**(7): 903-9.
- Wang, Y., D. Gao, et al. (2003). "Targeting LFA-1 synergizes with CD40/CD40L blockade for suppression of both CD4-dependent and CD8-dependent rejection." *Am J Transplant* **3**(10): 1251-8.
- Ward, K. A., L. A. Stewart, et al. (2006). "CD34+-derived CD11c+ + + BDCA-1+ + CD123+ + DC: expansion of a phenotypically undescribed myeloid DC1 population for use in adoptive immunotherapy." *Cytotherapy* **8**(2): 130-40.
- Warth, R., K. Hamm, et al. (1999). "Molecular and functional characterization of the small Ca(2+)-regulated K+ channel (rSK4) of colonic crypts." *Pflugers Arch* **438**(4): 437-44.
- Watkins, S. C. and R. D. Salter (2005). "Functional connectivity between immune cells mediated by tunneling nanotubes." *Immunity* **23**(3): 309-18.

- Wei, A. D., G. A. Gutman, et al. (2005). "International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels." *Pharmacol Rev* **57**(4): 463-72.
- Wei, S. H., O. Safrina, et al. (2007). "Ca²⁺ signals in CD4⁺ T cells during early contacts with antigen-bearing dendritic cells in lymph node." *J Immunol* **179**(3): 1586-94.
- Weichhart, T., G. Costantino, et al. (2008). "The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response." *Immunity* **29**(4): 565-77.
- Wild, J., M. J. Grusby, et al. (1999). "Priming MHC-I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to exogenous hepatitis B surface antigen is CD4⁺ T cell dependent." *J Immunol* **163**(4): 1880-7.
- Wing, K., E. Suri-Payer, et al. (2005). "CD4⁺CD25⁺-regulatory T cells from mouse to man." *Scand J Immunol* **62**(1): 1-15.
- Woltman, A. M., J. W. de Fijter, et al. (2000). "The effect of calcineurin inhibitors and corticosteroids on the differentiation of human dendritic cells." *Eur J Immunol* **30**(7): 1807-12.
- Woltman, A. M., J. W. de Fijter, et al. (2001). "Rapamycin induces apoptosis in monocyte- and CD34-derived dendritic cells but not in monocytes and macrophages." *Blood* **98**(1): 174-80.
- Wu, L., C. L. Li, et al. (1996). "Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny." *J Exp Med* **184**(3): 903-11.
- Wu, L. and K. Shortman (2005). "Heterogeneity of thymic dendritic cells." *Semin Immunol* **17**(4): 304-12.
- Wu, M. M., J. Buchanan, et al. (2006). "Ca²⁺ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane." *J Cell Biol* **174**(6): 803-13.
- Wulff, H., M. J. Miller, et al. (2000). "Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, IKCa1: a potential immunosuppressant." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(14): 8151-6.
- Xia, X. M., B. Fakler, et al. (1998). "Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels." *Nature* **395**(6701): 503-7.
- Yang, J., S. M. Bernier, et al. (2003). "LF15-0195 generates tolerogenic dendritic cells by suppression of NF-kappaB signaling through inhibition of IKK activity." *J Leukoc Biol* **74**(3): 438-47.
- Yang, J., M. O. Brook, et al. (2007). "Allograft rejection mediated by memory T cells is resistant to regulation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(50): 19954-9.
- Yang, L., G. Liu, et al. (2007). "Protein kinase G phosphorylates Cav1.2 alpha1c and beta2 subunits." *Circ Res* **101**(5): 465-74.
- Yoneyama, M., M. Kikuchi, et al. (2004). "The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses." *Nat Immunol* **5**(7): 730-7.
- Yoshimura, S., J. Bondeson, et al. (2001). "Effective antigen presentation by dendritic cells is NF-kappaB dependent: coordinate regulation of MHC, co-stimulatory molecules and cytokines." *Int Immunol* **13**(5): 675-83.
- Young, J. W. and R. M. Steinman (1990). "Dendritic cells stimulate primary human cytolytic lymphocyte responses in the absence of CD4⁺ helper T cells." *J Exp Med* **171**(4): 1315-32.
- Zajac, A. J., J. N. Blattman, et al. (1998). "Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function." *J Exp Med* **188**(12): 2205-13.

- Zhang, S. L., A. V. Yeromin, et al. (2006). "Genome-wide RNAi screen of Ca(2+) influx identifies genes that regulate Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel activity." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(24): 9357-62.
- Zhang, S. L., Y. Yu, et al. (2005). "STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane." Nature **437**(7060): 902-5.
- Zhang, Z., J. Tang, et al. (2001). "Activation of Trp3 by inositol 1,4,5-trisphosphate receptors through displacement of inhibitory calmodulin from a common binding domain." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(6): 3168-73.
- Zhao, G., Y. Zhao, et al. (2007). "Hypersensitivity of BKCa to Ca²⁺ sparks underlies hyporeactivity of arterial smooth muscle in shock." Circ Res **101**(5): 493-502.
- Zheng, S. G., J. D. Gray, et al. (2002). "Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors." J Immunol **169**(8): 4183-9.
- Zheng, Y., C. N. Manzotti, et al. (2004). "CD86 and CD80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells." J Immunol **172**(5): 2778-84.
- Ziegler, S. F. (2006). "FOXP3: of mice and men." Annu Rev Immunol **24**: 209-26.
- Zocchi, M. R., A. Rubartelli, et al. (1998). "HIV-1 Tat inhibits human natural killer cell function by blocking L-type calcium channels." J Immunol **161**(6): 2938-43.
- Zsiros, E., K. Kis-Toth, et al. (2009). "Developmental switch of the expression of ion channels in human dendritic cells." J Immunol **183**(7): 4483-92.
- Zuniga, E. I., D. B. McGavern, et al. (2004). "Bone marrow plasmacytoid dendritic cells can differentiate into myeloid dendritic cells upon virus infection." Nat Immunol **5**(12): 1227-34.

Annexes

Annexe 1

The ORAI-1 and STIM-1 complexe controls human dendritic cell maturation

Romain Félix^{*}, David Crottès^{*}, Anthony Delalande[†], Jérémy Fauconnier[‡], Yvon Lebranchu^{*§}, Jean-Yves Le Guennec[‡] and Florence Velge-Roussel^{*¶}.

^{*} EA 4245 Cellules Dendritiques et Greffes, Université François Rabelais, IFR-136 Agents Transmissibles et Infectiologie, UFR de Médecine, 10 Bd Tonnellé, F-37032 Tours, France.

[†] Centre de Biophysique Moléculaire CNRS UPR 4301, F-45000 Orléans ; Institut National de la Santé et de la Recherche Médical U930 Imagerie et Cerveau, Equipe 5, 10 Bd Tonnellé, F- 37032 Tours

[‡] Institut National de la Santé et de la Recherche Médical U637, Physiopathologie Cardiovasculaire, F-34295 Montpellier, France.

[§] Service de Néphrologie et d'Immunologie Clinique, CHRU Tours, 2 Bd Tonnellé, F-37032 Tours, France.

[¶] UFR des Sciences Pharmaceutiques, Av Monge, F-37000 Tours, France.

Corresponding author at:

Dr. Florence Velge-Roussel

Université François Rabelais, EA 4245 « Cellules Dendritiques et Greffes »

UFR de Médecine,

10 Boulevard Tonnellé, 37032 Tours Cedex, France.

Telephone: +33 2 47 36 60 58

Fax: +33 2 47 36 61 47

e-mail: florence.velge-roussel@univ-tours.fr

Keywords: STIM/ORAI, SOC, Dendritic cell, Immunology, physiology

ABSTRACT

The human dendritic cells (DC) play a key role in the immune response. Although Ca^{2+} -signaling processes are thought to underlie many DC functions, the Ca^{2+} entry pathways are known only in mouse model. The depletion of intracellular calcium stores appears the most striking pathway to increase the cytosolic Ca^{2+} concentration. The STIM-1 protein, a putative Ca^{2+} -sensor in the endoplasmic reticulum, induces the activation of store-operated conductance after clustering. The most thoroughly studied of these conductances are the Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) channels, and recent studies have identified the ORAI-1 protein as comprising the essential pore-forming subunit of these channels and its activator, STIM-1. Therefore, we investigated Ca^{2+} signalling in DC maturation using Ca^{2+} imaging. The extracellular calcium, alone, induces a spontaneous maturation of human DC. However, the response to the inflammatory mediators or PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Pattern) is due to a depletion of intracellular Ca^{2+} stores that induces store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) across the plasma membrane. This Ca^{2+} influx was inhibited by 2-APB and exhibited a Ca^{2+} permeability similar to the Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel (CRAC) found in T lymphocytes. Moreover, the level of phenotypic human DC maturation was correlated with the extracellular Ca^{2+} concentration and enhanced by Thapsigargin or PAMPs treatments. These results suggest that CRAC is a major pathway for Ca^{2+} entry in human myeloid DC and support the proposal that SOCE mechanism controls the human DC maturation and secretion of cytokines.

1. INTRODUCTION

Ca^{2+} signals, particularly calcium influx, contribute to the functional aim of many cell types in the immune system, including T cells, mast cells, macrophages and dendritic cells (1). Furthermore, Ca^{2+} could be taken in as a second messenger in numerous other cell types (whether excitable or non-excitable). In the case of non-excitable cells, different ion channels such as ROC (Receptor Operated Channel) and SOC (Store Operated Channel) can manage this influx (2), independently of their type. In immune cells, remain SOCs involved in T cell function were identified as ORAI-1-STIM-1 couple (1). However, even if their presence and their functionality were demonstrated in murine DC, very few studies on human DC addressed the role of these proteins in Ca^{2+} homeostasis and the role of ion channels in cell functionality. This is of importance because it is known that there is a great discrepancy between murine and human DC as regards their RyR proteins for example. In fact, in mouse model, these channels are responsible of the initiation of maturation process. While, the RyR (type 1) channels initiate the antigen presentation process for hDC before their maturation.

Dendritic cells are highly specialized antigen presenting cells (APC) that are able to induce both specific immunity and immune tolerance. Because of these properties, they represent the most important cells of the immune system (3, 4).. On the basis of the information gathered from the tissue where they reside, DCs adjust their functional activity to ensure that protective immunity is favoured while unwanted or exaggerated immune responses are prevented. A wide variety of signals from neighbouring cells affecting DC functional activity has been described. Immature DC become mature DC with functional competences under a very large number of stimuli through numerous cell surface receptors such as cytokine receptors, TLR or type C lectins (5, 6). While a sustained increase in intracellular Ca^{2+} accompanies T and B cells receptor signalling and is necessary for gene activation, cellular proliferation and cytokine secretions (7, 8). The process of DC maturation induced by foreign agents plays a

key role in immune responses but the function of calcium signalling in this phenomenon is not well understood. A previous study suggested that a Ca^{2+} influx (as well named CCE, SOCE or CRAC) might be involved in murine DC maturation (9). Among different modalities of entry, the involvement of an ion channel (selective to Ca^{2+}) sensitive to ER Ca^{2+} stocks, named SOC (Store Operated Channel) can managed this influx (2). SOCs have the property to be activated by ER Ca^{2+} depletion and lead a Ca^{2+} influx, named CCE (Capacitative Calcium Entry). This CCE allows reloading of the Ca^{2+} stocks of ER, as well as regulating several physiological functions (10).

In hDC, very few studies addressed the calcium pathway involvement in the maturation phenomenon, but they all underline the importance of this ion. The use of a calcium ionophore induced a mature phenotype in human DC (11), as well as an inhibition of IL-12 secretion (12). In addition, a study in human showed the involvement of PLC (Phospholipase C) in the maturation process of hDC induced by LPS (13). Indeed, PLC activation induces the synthesis of IP_3 (Inositol Triphosphate), which in turn induces a release of ER Ca^{2+} stocks through activation of IP_3R (IP_3 Receptor). Because store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) seems to be the main mechanism used by many cell types to initiate signal transduction, we were interested by two molecules recently discovered: ORAI-1 and STIM-1 (1). These two molecules have been involved in T cell activation through the MHC complex (14). These two proteins, as they move to the immunological synapse, are up-regulated during T cell activation and provoke cell polarization (15). One of the implications of ORAI-1's and STIM-1's up-regulation in the early stages of the immune response would be to amplify and ensure CRAC channel-mediated Ca^{2+} signalling for clonal expansion, differentiation and calcium-dependent regulation of gene expression in T cells. Thus, the expression of ORAI-1 and STIM1 carries out a positive feedback on Ca^{2+} signal (15). A single amino acid change in ORAI-1 abolishes CRAC channel function and T- cell activation without any modification in

protein expression profile. Severe combined immunodeficiency (SCID) patients have been associated with lack of both functional ORAI and STIM-1. Although the number of CD4 and CD8 T cells and B cells are normal in ORAI-deficient patients (16), the functional activity of their T cells is severely compromised and patients are not able to build a specific and protective antibody response. To the best of our knowledge, DC functionality in CRAC-deficient patients has not been addressed (17).

Consequently, Ca^{2+} signal via the ORAI-1 and STIM1 couple is likely to be of importance in immunological regulation. A clinical study done by Weir *et al.* (18) showed that transplanted people treated by calcium inhibitors, presented a better renal function or survival. We therefore made the hypothesis that ion inhibitors may have an impact not only on cardiac cells but also on immune cells and mainly on dendritic cells, which are the main cells involved in the induction of the immune response. To elucidate the mechanisms by which Ca^{2+} participates in hDC maturation, we analyzed early events of this process and functional consequences of its inhibition.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Generation of Dendritic Cells from Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC)

Peripheral blood cells were obtained by cytopheresis from healthy volunteers following informed written consent. PBMCs were isolated by Ficoll Hypaque density gradient centrifugation (density 1.077, Lymphoprep; Abcys SA, France) and resuspended in culture medium after 2 washings. Monocyte-derived dendritic cells were prepared after selective adhesion of monocytes to plastic as previously described (19, 20). Briefly, PBMC were either incubated for 45 min at 37°C in 5% CO₂ in culture flasks (100 million in a 75 cm²-Falcon flask, Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA), and non-adherent cells were discarded and medium containing rhGM-CSF (1000 U/ml) and rhIL-4 (25 ng/ml) was added. Cells were suspended in culture medium (containing 1000 U/ml rhGM-CSF and 25 ng/ml rhIL-4). On day 5, immature DC were harvested, washed and suspended in culture medium with IL-4 and GM-CSF.

2.2. Cell treatment

TLR agonists (LPS (50 ng/ml), Zymosan (25 µg/ml) and TNF-α (20 ng/ml)) and Ca²⁺ inhibitors such as Thapsigargin (750 nM), D609 (100µM) or 2-APB (100µM) were added directly to immature DC for 18 hours in individual wells. All drugs and chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Cells were harvested, washed and used for analyses in flow cytometry, mixed culture reaction or spectrofluorometric analysis. For reagents suspended in dimethyl sulfoxide (DMSO), an equal volume of DMSO was added to control cultures. At the concentrations used, DMSO has no inhibitory or stimulatory effects on DC.

2.3. Solutions

The physiological saline solution (PSS) had the following composition (in mM): NaCl 140, KCL 5.4, MgCl₂ 1, NaH₂PO₄ 0.33, CaCl₂ 1.8, D-Glucose 11.1 and HEPES 10; adjusted to 7.4 with 1M NaOH. The Ca-free solution had the following composition (in mM): NaCl 140, KCL 5.4, MgCl₂ 1, NaH₂PO₄ 0.33, EGTA 1, D-Glucose 11.1 and HEPES 10; adjusted to 7.4 with 1M NaOH. Thapsigargin (TG), 2-ABP (2-AminoPhenyl Borate), LPS (Lipopolysaccharide), Zymosan and TNF- α were added to the PSS at concentrations indicated in figure legends.

2.4. Fluorescence measurements

Intracellular Ca²⁺ concentrations were estimated using the ratiometric fluorescent dye Fura-2. Immature DC were plated on cover slips (Fluorodish FD35-100, WPI, UK) coated with poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) in PSS (see Solutions). Cells were incubated in PSS containing Fura-2 AM (5 μ M) (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France), the membrane-permeant acetoxymethyl ester form of Fura-2, diluted in pluronic acid-F127 (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France), during 60-75 min at 37°C. Cells were then washed with PSS and left for 2 additional minutes before recording.

The dishes were placed on the stage of a Nikon Eclipse TE2000-S inverted epi-illumination microscope (Nikon, France). The excitation light source was a 75-W Xenon arc lamp. Excitation light at the two-excitation wavelengths maxima of Fura-2 (340/380nm) was chopped by a monochromator (Cairn Optoscan, UK). The excitation protocol was a 50 ms excitation at each wavelength every 2 s. Excitation light was directed through a 60X oil immersion objective with a numerical aperture of 1.4 (Nikon Plan Apo, France). Fluorescence emission at 510 \pm 20 nm was detected by a photomultiplier tube (PMT) placed on the side of the microscope. The analogical signal of PMT was digitized by a Digidata 1322 A converter

(Axon Instrument, USA) at a sampling frequency of 2 kHz. This numeric signal was analyzed using Clampex 8.2 (Axon Instrument, USA). Background fluorescence was determined at 340 and 380 nm from an area of the dish free of cells after experiment and was routinely subtracted.

2.5. Flow Cytometric Analysis

Dendritic cells were incubated at 4°C with saturating concentrations of fluorochrome-conjugated mAbs in the dark for 30 min, washed twice with PBS, fixed in 0.5% PFA-PBS solution and analyzed with a FACSCanto (Becton Dickinson, France). Dead cells were gated out on the basis of their light scatter properties. Data were analyzed with Diva Software.

For intracellular detection of IFN- γ , cells were incubated in Golgistop solution (Becton-Dickinson) for the last 5 hours of culture, next the cells were permeabilized with BD cytofix/cytoperm solution (Becton-Dickinson, France) and finally labeled with an APC-coupled antibody specific for IFN- γ (Becton-Dickinson, France) according to the manufacturer's instructions.

2.6. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)

Cell culture supernatants were harvested and stored at -80 °C until assayed for cytokines. Human IL-10, IFN- γ and IL-12 p70 concentrations were measured by ELISA using Ready-Set-Go kits from e-Bioscience (Montrouge, France) according to the manufacturer's instructions. Briefly, microtiter plates were coated overnight at 4°C with antibodies specific for IL-12p70, IL-10 and IFN- γ , from e-Bioscience (Montrouge, France). The plates were washed and blocked according to the manufacturer's instructions. Samples and standards

were analyzed in triplicate, and assayed with the avidin-peroxydase system. Optical densities were measured in an ELISA plate-reader at 450 nm wavelengths.

2.7. RNA extraction and Reverse Transcriptase PCR

Total RNA was isolated using RNA extraction minikit (Qiagen, USA) following the manufacturer's protocol. Prior to reverse transcription, total RNA was treated with DNAase I for 30 min at room temperature. RNA was then reverse-transcribed using Superscript II reverse transcriptase and oligodT (Invitrogen, France). PCR was performed using specific primers designed for STIM-1 or ORAI-1 (5'-GCATCTTGCCTGGAGACCGT and 5'-CAAGACGGACGCATACATCC for STIM-1; 5'-GTCACCTACCCGGACTGGAT and 5'-TGGAGGCTTTAAGCTTGGCG for ORAI-1). In order to prevent amplification of genomic DNA, forward and reverse primers used spanned neighbouring exons. PCR products were visualized by ethidium bromide (Sigma-Aldrich, France) staining.

2.8. Immuofluorescence and confocal analysis

The hDC were spun onto glass LAB-TEK (Nunc International, USA) by Poly-L Lysine (Sigma-Aldrich, France) before immunofluorescence labelling of STIM-1 and ORAI-1. Cells were permeabilized and fixed by BD Cytotfix/CytopermTM Plus kit (BD Biosciences, USA) in labelling medium (PBS with 4% FBS and 0,1% Azide) at room temperature. After fixation, samples were then incubated with purified antibodies diluted in labelling medium during 1 hour at room temperature. We used a mouse anti-human STIM-1 (Abnova, USA) and a rabbit anti-human ORAI-1 (Anticorps-online, Germany) as primary reagent. After washing cells twice with labelling medium, specific staining was detected by Alexa Fluor 488 conjugated goat anti-mouse IgG and Alexa Fluor 564 conjugated goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, France), respectively for STIM 1 and ORAI-1. Cover slips were placed in

mounting medium (Invitrogen, France) and visualized with a LMS510 meta Zeiss confocal microscope equipped with a x63 water immersion objective (NA:1.2). Images shown are single optical slides, with the double labelling.

2.9. RNA interference

Silencers select pre-designed siRNAs (Santa Cruz Biotech, USA) specific for STIM-1 or ORAI-1 were used to inhibit STIM-1 and ORAI-1 expression. In each experiment, $4 \cdot 10^5$ immature DC were plated in 24-well plates in 400 μ l growth medium containing 10% FBS without antibiotic. Lipofectamine RNAi-Max (1 μ l/well; Invitrogen, France) was first diluted in 50 μ l Opti-MEM (Invitrogen, France) for 5 minutes before mixing with an equal volume of Opti-MEM containing 20pmol of siRNA. After 20 minutes, 100 μ l of the Lipofectamine/siRNA mixture were added to the cells to perform siRNA transfection. Fresh growth medium (500 μ l) was added 4 hours after transfection. Cells were cultured for 36 hours at 37°C to obtain optimal silencing of targeted genes. The efficacy of gene silencing was testing by western blot and flow cytometry. A siRNA Control (Santa Cruz Biotech, USA) was used as negative control. The sequence of this siRNA Control was not specific to any genes.

2.10. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using a nonparametric Mann-Whitney test with XLSTAT 2007 software. For all tests, a *p*-value of <0.05 was regarded as statistically significant.

3. RESULTS

3.1 Extracellular calcium modifies hDC phenotype.

The mature phenotype of human DCs is defined as the concomitant cell surface expression of CD86, CD80, HLA-DR, CD83 and CD25. Thus, we evaluated the expression of these markers in presence of different extracellular calcium concentrations by flow cytometry. We analyzed the percentage of hDC quadruple positive cells (CD86/ HLA-DR, CD80, CD83) by flow cytometry. As represented on Fig. 1A, an increased extracellular Ca^{2+} concentration resulted in an increase of the percentage of cells expressing CD80, HLA-DR, CD83 and CD86.). This percentage of quadruple positive cells increased following the extracellular Ca^{2+} concentration (from 2 to 4 mM) (Fig.1 B). Moreover, the surface expression of CD25 that is a discriminating maturation marker (Mnasria *et al*, 2008) increased from 24.6% to 43.3 % following the increasing Ca^{2+} concentration from 0.4 (RPMI) to 4 mM (Fig. 1C). In contrast, only 2.7% of hDC expressed CD25 at their surface in the absence of Ca^{2+} .

3.2. Calcium entry in during hDC maturation is a Calcium capacitive entry (CCE)

Since we demonstrated that extracellular calcium was able to modify the expression of phenotype markers in hDC, we hypothesized that a calcium entry occurs during the earlier events of hDC maturation. In several cell types, the store-operated Ca^{2+} entry or CCE can routinely be measured upon store depletion by inhibition of the vesicular Ca^{2+} -ATPase using Thapsigargin (TG, an inhibitor of SERCA-2A) and LPS, Zymosan or TNF- α treatment may lead to activation of CRAC channels. A CCE following calcium store depletion (from ER stocks) was observed after application of TG, an inhibitor of SERCA-2A and it was sensitive to 2-APB (Fig. 2A). Stimulation of hDC with TLR (Toll like receptor) agonists such as LPS (50 ng/ml) and TNF- α (20 ng/ml) resulted in a rapid and irreversible increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Fig. 2B and 2D, respectively). To demonstrate the nature of this CCE, a PSS solution was perfused

with or without 100 μ M 2-ABP (Fig. 2B and 2D). 2-APB significantly blunted but did not fully abrogate the increase of $[Ca^{2+}]_i$ following LPS or TNF- α perfusions. In the case of TNF- α and LPS, the Ca^{2+} entry consisted in two components, a continuous and a transient one corresponding to the entry of external calcium after depletion of the RE as shown by the 0 Ca^{2+} period. Moreover, the use of 2-APB induced the reversibility of the continuous component in CCE (Fig. 2B and 2D). In contrast, only a transient and reversible increase of $[Ca^{2+}]_i$ was observed when Zymosan (25 μ g/ml) was applied on hDC (Fig. 2C). A decrease of the Zymosan-induced CCE amplitude was observed in presence of 2-APB with a lesser effect compared to LPS and TNF- α (Fig. 2C).

3.3. Phenotype expressions and cytokine secretions of hDC are under Calcium dependence

As shown in Figure 1, hDC were able to exhibit a mature phenotype when the extracellular calcium concentration increased, the mature phenotype status being defined as the simultaneous expression of at least the CD86/ HLA-DR, CD80, and CD83 markers. In control condition (iDC condition), quadruple positive cells represented 6.3% of the hDC population. During the next 18 hours of culture in presence of different maturing agents, the expression of these markers increased up to 31.1% with TG, 57.2% with LPS, 57.3% with Zymosan and 31.4% with TNF- α treatment (Fig. 3). The expression of these four markers was sensitive to 2-APB ($p < 0.05$) and was decreased by about 50%, in all conditions.

Cytokine secretion by hDC is an essential step leading to T cell activation and polarization. We therefore evaluated the cytokine secretion of hDC by ELISA using different inhibitors (TG or 2-APB) and maturing agents. TG-treated hDC were not able to secrete any cytokine (Fig. 4). In our conditions, LPS-treated hDC secreted IL-12, IL-10 and Zymosan-treated hDC secreted IL-10 as cited in the literature (21-23) (Fig. 4A and 4B). These cytokine productions were abolished in presence of 2-APB (Fig. 4) or SKF 96365, another inhibitor of

CCE (data not shown). Secreted IFN- γ was also significantly reduced by the addition of 2-APB ($p < 0.05$).

3.4. Expression of ORAI-1 and STIM-1 in hDC

In order to show both ORAI-1 and STIM-1 proteins on hDC, we evaluated their protein expression by confocal microscopy (Fig. 5) using a double staining (ORAI-1 in red and STIM-1 in green). These two proteins appeared to be co-localized on the same cells for all conditions except for Zymosan. In this latter condition, puncta of ORAI-1 (in red) were observed and STIM-1 (in green) was not detectable in the structures, but it appeared homogeneously distributed in hDC (Fig. 5).

3.5. ORAI-1 and STIM-1 involvement in hDC functional activities

To evaluate the involvement of ORAI-1 and STIM-1 in hDC maturation, a siRNA strategy was used against these proteins in presence of maturing agents. We first checked whether a CCE was observed in presence of control siRNA (si-Ctl) (Fig. 6A). Ca^{2+} (2mM) was re-introduced in perfuse solution after a treatment by 750nM TG in Ca^{2+} free solution. This re-introduction induced a sustained increase of intracellular calcium in hDC ($\text{F340/F380} = 0.23 \pm 0.03$). The profile of this CCE is comparable to those obtained in Figure 2A. In Si-STIM-1 conditions, the CCE amplitude induced by TG treatment decreased ($\text{F340/F380} = 0.091 \pm 0.012$) (Fig 6B). The CCE amplitude was equally diminished by a treatment with Si-ORAI-1 ($\text{F340/F380} = 0.104 \pm 0.015$) (Fig 6C). The western blotting analyses of cell extracts in the different conditions clearly demonstrated a decrease of protein expression (Fig 6D) in the si-RNA treated cells. The total amount of intracellular Ca^{2+} was significantly decreased by both si-RNA treatments as shown on fig.6 E.

The involvement of ORAI-1 and STIM-1 in DC maturation was also studied evaluated by the analysis of surface markers expression such as CD83, CD86, CD80, and HLA-DR. The increased of the expression of these markers observed in figure 3, with TG, LPS, Zymosan and TNF- α was reduced by a treatment with si-STIM-1 or si-ORAI-1 (Fig. 7).

4. DISCUSSION

The data reported here clearly underline the importance of Ca^{2+} in human dendritic cells (hDC) maturation, and suggest a role for ORAI-1 and STIM-1 in hDC functions. Moreover, our study demonstrates the involvement of a Ca^{2+} influx in the earlier events of hDC maturation. In fact, we showed that ORAI-1 and STIM-1 - the CRAC channel and its activator - are rapidly recruited following TLR or TNF-R activation, resulting in the increase of intracellular calcium concentration. It was previously known that ion channels were involved in immune cell functions and more precisely in dendritic cell functionality as Zsiros *et al.* (24) hypothesized the involvement of two types of ion channels in migration ($\text{Na}_v1.7$) and cytokine secretion ($\text{K}_v1.3$) according to the status of hDC and without demonstrating a role of Ca^{2+} . Nonetheless, their results demonstrated that Ca^{2+} did not play a role in hDC physiology. Here, however, we showed, for the first time to the best of our knowledge, that maturing agents, such as TLR agonists or cytokines act through a CCE in hDC. Indeed, Ca^{2+} alone, via a modification of its concentration gradient, induced a maturation of hDC. Similar results strengthened those obtained in a mouse model (9) where the author described a phenomenon named CRAC (Ca^{2+} -Release Activated- Ca^{2+}) as a major entry of Ca^{2+} in murine DC. We showed that, in hDC, stimulation with TLR agonists induced a SOCE (Store Operated Calcium Entry) which was inhibited by 2-APB (100 μM), an known inhibitor for this kind of Ca^{2+} entry. This SOCE is involved in the hDC functions because the treatment by 2-APB inhibited the expression of maturation markers (principally CD25 and CD83) and the inhibition of cytokine production (IL-12, IL-10 or IFN- γ). These results are confirmed by si-RNA experiments (Fig.7). Thus, Ca^{2+} is absolutely necessary for hDC maturation and activation as evidenced by a modulation of phenotype marker expression and cytokine secretion by SOCE. In mouse DC models, different CCE have been shown using TG and nifedipine (a C-type calcium channel inhibitor). TG was able to induce a matured

phenotype in murine DC (9). The evidenced CCE appears following a total Ca^{2+} depletion from the ER. The ion channels responsible for this depletion are IP_3R or members of the RyR family (RyR1, RyR2 or RyR3). In murine DC, the RyR1 protein was shown to be functional (25) but its status in hDC was not known. In our hands, Dantrolene (a RyR1 inhibitor) had no effect on the CCE induced on hDC by the maturing agents TG, LPS, Zymosan and $\text{TNF-}\alpha$ (data not shown). O'Connell *et al.* (26) showed that the RyR (and particularly RyR1) proteins were involved in the CCE induced by caffeine in murine DC. In our experiments on hDC, the situation appears to be different as the observed CCE exhibited different profiles depending on the maturing agents used. It is therefore possible that, on each CCE profile, specific ion channels could be involved (27). Our characterization of these CCE is mainly based on pharmacological studies by using 2-APB, which is known to block different channels such as TRPC 1, 3, 4, 5 and 6, or SKF 96365, a potent inhibitor of TRPC 6 and 7 (28). The CCE showed is induced in hDC by TG or IP_3R was inhibited by SKF 96365, suggesting the involvement of TRPC 6 and 7 as in cancer cells (29). The CCE profiles so obtained distinguished two types of maturing agent, those such as $\text{TNF-}\alpha$ and LPS that were able to induce an irreversible CCE with two components and Zymosan that induced a reversible CCE with a single component. The CCE induced by $\text{TNF-}\alpha$ and LPS comprised one component that appeared 2-APB-insensitive and transient, whereas the other was sustained and 2-APB-sensitive. As for Zymosan, the CCE was reversible upon washing. This CCE reversibility suggested that there is at least two different Ca^{2+} pathways used for CCE in hDC. In our work, the kinetics of the Ca^{2+} increase induced by LPS or $\text{TNF-}\alpha$ was slower than the one induced by Zymosan. In fact, the CCE obtained with LPS or $\text{TNF-}\alpha$ seemed to involve ion channels of both the ER and the plasma membrane, whereas the CCE obtained with Zymosan seemed only to require ion channels of the plasma membrane. However, analyses using patch-clamp technique will be necessary to characterize the ion current so observed. Moreover, it can be

critically important that 2-APB treatment induced an increase of basal Ca^{2+} level. As the specificity of 2-APB is known, these channels are selective for Ca^{2+} and K^+ and the membrane potential of hDC is governed by potassium conductance. At the holding potential, if the potassium efflux is inhibited through TRP channels, the plasma membrane should be depolarized and the current resulting from Na-Ca exchanger functioning diminished. The resultant of this depolarization is a decrease in Na^+ influx and Ca^{2+} efflux, leading to an intracellular Ca^{2+} concentration increase.

Moreover, both TLR and GPCR receptor signalling have substantive roles in the regulation of DC function. Signalling through either TLR2 or TLR4 induces the maturation of iDC and alters the expression of cytokines, *i.e.*, induces IL-12, IL-10 and IFN- γ synthesis. Indeed, in mouse and human models, the activation of TLR-4, a GPCR, provokes the recruitment of G proteins and their regulators (RGS: regulator of G protein signalling) (30). These regulator proteins could be involved in the Ca^{2+} store depletion after TLR or TNF-R stimulation. Nevertheless, the cytokine production (IL-12, essentially) is regulated by GPCRs (31). Here, we showed that the production of IL-12 was totally abolished by treatment with 2-APB. Therefore, non-identified GPCR regulators could interact with signalling pathways that induce cytokine production after a TLR or TNF-R stimulation.

The most striking finding was that the principal component of the CCE induced by store-depletion was mainly due to ORAI-1 and STIM-1 – the CRAC channel pore subunit and its activator, respectively. Previous works have shown that the ORAI-1/STIM-1 complex in murine BM-DC is one of the main calcium pathway (32). We showed that these proteins are expressed in hDC treated with different maturing agents. ORAI-1 mRNA was not modified and this result was in coherence with the CCE profile. As this CCE is reversible when Ca^{2+} is re-introduced in the bath solution (except for Zymosan), ORAI-1 could be implicated in the Ca^{2+} entry. A treatment of hDC with specific si-RNA (si-STIM-1 or si-ORAI-1) induced a

decrease of the CCE amplitude but not its complete abolition, indicating that only part of this CCE might be due to the ORAI-1/STIM-1 complex. Moreover, these two proteins are co-localized in hDC stimulated by several agents. This might suggest that the observed CCE is the result of the activation of different ion channels such as members of the TRPC or ORAI families (ORAI-3, for example). Montiani *et al.* (33) showed that ORAI-3 was a novel store-operated channel in cancer cells. However, ORAI-1 labelling on Zymosan-treated hDC only showed structures as puncta (Fig. 5C). Indeed, Zymosan is up taken in mouse and human DC forming phagocytosis vesicles following the membrane modelling (34, 35).

Furthermore, our study demonstrates that ORAI-1 and STIM-1 - the CRAC channel pore subunit and its activator, respectively - are rapidly recruited to induce a Ca^{2+} influx after TLR or TNF-R activation. In T cells, these two proteins are recruited and migrated to the immunological synapse (15). Depending on the maturing agent used, the recruitment of this couple is not identical. When TNF- α is used, the maturation is lesser than the one induced with LPS or TG. Thus, in this condition, the coupling between these two proteins has a less intensity (Fig. 5C). When Zymosan is used, these proteins are not clearly co-localized. This is due to the up-take of this maturing agent during the activation phase (34, 35).

Beyond their effect on the early CCE in hDC maturation, the ORAI-1 and STIM-1 complex might have an impact on the whole immune physiology through the ionic homeostasis in hDC as well as in T cell. Indeed, SOCE is severely impaired in cells from patients who suffer from combined immunodeficiency. In these cases, store depletion with TG failed to induce Ca^{2+} influx even in the presence of 2 mM $[\text{Ca}^{2+}]$ and despite normal release of Ca^{2+} from ER stores. In those patients, no mutations in ORAI-1 were found but mRNA and protein expression levels of STIM-1 were strongly reduced or undetectable in these patients' cells, which is consistent with the observed pronounced defect in SOCE (36). The clinical phenotype associated with STIM-1 deficiency in patients is very similar to that of

ORAI-1 deficiency, suggesting that both genes act in the same pathway and are critical for SOCE in the same tissues (17).

Additionally, deregulated ion homeostasis has been shown to be associated with pathophysiological processes in inflammation and autoimmune diseases. Increased Ca^{2+} responses may be involved in the breakdown of B-cell tolerance and autoimmunity in systemic lupus erythemateous (37, 38). In addition, the disturbance of Ca^{2+} signalling is linked to the generation of autoreactive T cells involved in several diseases (rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and type I diabetes). Pennington *et al.* (39) are currently developing therapeutic treatments for these diseases through the inhibition of specific potassium channels (Kv1.3 and Kv1.5). However, ion channels could also play a “non-ion channel” role as transcription factor. Cabral *et al.* (40) showed that a knock-down of Ca_v1 prevented asthma in a mouse model. This result is in agreement with our results because cytokine production by hDC was significantly decreased by a treatment with 100 μM of 2-APB or by a specific si-RNA against STIM-1 or ORAI-1 (data not shown). Moreover, in organ transplantation, some works demonstrated the impact of channel inhibitors in graft survey (41, 42). The clinical applicability of the immunosuppressive capability of Calcium Channels Blockers in addition to conventional immunosuppressive drugs remains to be firmly established. Early studies with diltiazem and verapamil demonstrate a reduction in early graft non-function and rejection in cyclosporine-treated renal transplant recipients (18). In fact, the role of Ca^{2+} and, more precisely, that of the ORAI-1 and STIM-1 complex in hDC physiology could be a good target candidate for ion channels inhibitors in immuno-modulatory treatments.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Etablissement Français du Sang du Centre Atlantique of Tours for providing blood samples from healthy donors and Dr. F. ROUSSEL for revising the English text. This work was supported by François-Rabelais University of Tours.

REFERENCES

1. Cahalan, M. D., S. L. Zhang, A. V. Yeromin, K. Ohlsen, J. Roos, and K. A. Stauderman. 2007. Molecular basis of the CRAC channel. *Cell Calcium* 42:133.
2. Cai, X. 2007. Molecular evolution and structural analysis of the Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel subunit, Orai. *J Mol Biol* 368:1284.
3. Banchereau, J., and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245.
4. Bell, D., J. W. Young, and J. Banchereau. 1999. Dendritic cells. *Adv Immunol* 72:255.
5. Rossi, M., and J. W. Young. 2005. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol* 175:1373.
6. Ito, T., Y. J. Liu, and N. Kadowaki. 2005. Functional diversity and plasticity of human dendritic cell subsets. *Int J Hematol* 81:188.
7. Baixeras, E., G. Kroemer, E. Cuende, C. Marquez, L. Bosca, J. E. Ales Martinez, and C. Martinez. 1993. Signal transduction pathways involved in B-cell induction. *Immunol Rev* 132:5.
8. Oh-hora, M., and A. Rao. 2008. Calcium signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 20:250.
9. Hsu, S., P. J. O'Connell, V. A. Klyachko, M. N. Badminton, A. W. Thomson, M. B. Jackson, D. E. Clapham, and G. P. Ahern. 2001. Fundamental Ca²⁺ signaling mechanisms in mouse dendritic cells: CRAC is the major Ca²⁺ entry pathway. *J Immunol* 166:6126.
10. Parekh, A. B., and J. W. Putney, Jr. 2005. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* 85:757.
11. Czerniecki, B. J., C. Carter, L. Rivoltini, G. K. Koski, H. I. Kim, D. E. Weng, J. G. Roros, Y. M. Hijazi, S. Xu, S. A. Rosenberg, and P. A. Cohen. 1997. Calcium ionophore-treated peripheral blood monocytes and dendritic cells rapidly display characteristics of activated dendritic cells. *J Immunol* 159:3823.
12. Faries, M. B., I. Bedrosian, S. Xu, G. Koski, J. G. Roros, M. A. Moise, H. Q. Nguyen, F. H. Engels, P. A. Cohen, and B. J. Czerniecki. 2001. Calcium signaling inhibits interleukin-12 production and activates CD83(+) dendritic cells that induce Th2 cell development. *Blood* 98:2489.
13. Bagley, K. C., S. F. Abdelwahab, R. G. Tuskan, and G. K. Lewis. 2004. Calcium signaling through phospholipase C activates dendritic cells to mature and is necessary for the activation and maturation of dendritic cells induced by diverse agonists. *Clin Diagn Lab Immunol* 11:77.
14. Feske, S. 2010. CRAC channelopathies. *Pflugers Arch* 460:417.
15. Lioudyno, M. I., J. A. Kozak, A. Penna, O. Safrina, S. L. Zhang, D. Sen, J. Roos, K. A. Stauderman, and M. D. Cahalan. 2008. Orai1 and STIM1 move to the

- immunological synapse and are up-regulated during T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:2011.
16. Feske, S., Y. Gwack, M. Prakriya, S. Srikanth, S. H. Puppel, B. Tanasa, P. G. Hogan, R. S. Lewis, M. Daly, and A. Rao. 2006. A mutation in *Orai1* causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 441:179.
 17. Feske, S. 2009. *Orai1* and *STIM1* deficiency in human and mice: roles of store-operated Ca^{2+} entry in the immune system and beyond. *Immunol Rev* 231:189.
 18. Weir, M. R. 1991. Therapeutic benefits of calcium channel blockers in cyclosporine-treated organ transplant recipients: blood pressure control and immunosuppression. *Am J Med* 90:32S.
 19. Sallusto, F., and A. Lanzavecchia. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179:1109.
 20. Lagaraine, C., C. Hoarau, V. Chabot, F. Velge-Roussel, and Y. Lebranchu. 2005. Mycophenolic acid-treated human dendritic cells have a mature migratory phenotype and inhibit allogeneic responses via direct and indirect pathways. *Int Immunol* 17:351.
 21. Faugaret, D., R. Lemoine, C. Baron, Y. Lebranchu, and F. Velge-Roussel. 2010. Mycophenolic acid differentially affects dendritic cell maturation induced by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide through a different modulation of MAPK signaling. *Mol Immunol* 47:1848.
 22. Lagaraine, C., R. Lemoine, C. Baron, H. Nivet, F. Velge-Roussel, and Y. Lebranchu. 2008. Induction of human CD4⁺ regulatory T cells by mycophenolic acid-treated dendritic cells. *J Leukoc Biol* 84:1057.
 23. Lemoine, R., F. Velge-Roussel, F. Herr, R. Felix, H. Nivet, Y. Lebranchu, and C. Baron. 2010. Interferon gamma licensing of human dendritic cells in T helper-independent CD8⁺ alloimmunity. *Blood*.
 24. Zsiros, E., K. Kis-Toth, P. Hajdu, R. Gaspar, J. Bielanska, A. Felipe, E. Rajnavolgyi, and G. Panyi. 2009. Developmental switch of the expression of ion channels in human dendritic cells. *J Immunol* 183:4483.
 25. Uemura, Y., T. Y. Liu, Y. Narita, M. Suzuki, S. Ohshima, S. Mizukami, Y. Ichihara, H. Kikuchi, and S. Matsushita. 2007. Identification of functional type 1 ryanodine receptors in human dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 362:510.
 26. O'Connell, P. J., V. A. Klyachko, and G. P. Ahern. 2002. Identification of functional type 1 ryanodine receptors in mouse dendritic cells. *FEBS Lett* 512:67.
 27. Barbet, G., M. Demion, I. C. Moura, N. Serafini, T. Leger, F. Vrtovsnik, R. C. Monteiro, R. Guinamard, J. P. Kinet, and P. Launay. 2008. The calcium-activated nonselective cation channel TRPM4 is essential for the migration but not the maturation of dendritic cells. *Nat Immunol* 9:1148.
 28. Clapham, D. E., D. Julius, C. Montell, and G. Schultz. 2005. International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev* 57:427.
 29. Pigozzi, D., T. Ducret, N. Tajeddine, J. L. Gala, B. Tombal, and P. Gailly. 2006. Calcium store contents control the expression of TRPC1, TRPC3 and TRPV6 proteins in LNCaP prostate cancer cell line. *Cell Calcium* 39:401.
 30. Shi, G. X., K. Harrison, S. B. Han, C. Moratz, and J. H. Kehrl. 2004. Toll-like receptor signaling alters the expression of regulator of G protein signaling proteins in dendritic cells: implications for G protein-coupled receptor signaling. *J Immunol* 172:5175.

31. Braun, M. C., and B. L. Kelsall. 2001. Regulation of interleukin-12 production by G-protein-coupled receptors. *Microbes Infect* 3:99.
32. Matzner, N., I. M. Zemtsova, T. X. Nguyen, M. Duszenko, E. Shumilina, and F. Lang. 2008. Ion channels modulating mouse dendritic cell functions. *J Immunol* 181:6803.
33. Motiani, R. K., I. F. Abdullaev, and M. Trebak. 2010. A novel native store-operated calcium channel encoded by Orai3: selective requirement of Orai3 versus Orai1 in estrogen receptor-positive versus estrogen receptor-negative breast cancer cells. *J Biol Chem* 285:19173.
34. Valera, I., N. Fernandez, A. G. Trinidad, S. Alonso, G. D. Brown, A. Alonso, and M. S. Crespo. 2008. Costimulation of dectin-1 and DC-SIGN triggers the arachidonic acid cascade in human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 180:5727.
35. Rogers, N. C., E. C. Slack, A. D. Edwards, M. A. Nolte, O. Schulz, E. Schweighoffer, D. L. Williams, S. Gordon, V. L. Tybulewicz, G. D. Brown, and C. Reis e Sousa. 2005. Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* 22:507.
36. Picard, C., C. A. McCarl, A. Papolos, S. Khalil, K. Luthy, C. Hivroz, F. LeDeist, F. Rieux-Laucat, G. Rechavi, A. Rao, A. Fischer, and S. Feske. 2009. STIM1 mutation associated with a syndrome of immunodeficiency and autoimmunity. *N Engl J Med* 360:1971.
37. Feske, S. 2007. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol* 7:690.
38. Liossis, S. N., B. Kovacs, G. Dennis, G. M. Kammer, and G. C. Tsokos. 1996. B cells from patients with systemic lupus erythematosus display abnormal antigen receptor-mediated early signal transduction events. *J Clin Invest* 98:2549.
39. Pennington, M. W., C. Beeton, C. A. Galea, B. J. Smith, V. Chi, K. P. Monaghan, A. Garcia, S. Rangaraju, A. Giuffrida, D. Plank, G. Crossley, D. Nugent, I. Khaytin, Y. Lefievre, I. Peshenko, C. Dixon, S. Chauhan, A. Orzel, T. Inoue, X. Hu, R. V. Moore, R. S. Norton, and K. G. Chandy. 2009. Engineering a stable and selective peptide blocker of the Kv1.3 channel in T lymphocytes. *Mol Pharmacol* 75:762.
40. Cabral, M. D., P. E. Paulet, V. Robert, B. Gomes, M. L. Renoud, M. Savignac, C. Leclerc, M. Moreau, D. Lair, M. Langelot, A. Magnan, H. Yssel, B. Mariame, J. C. Guery, and L. Pelletier. 2010. Knocking down Cav1 calcium channels implicated in Th2 cell activation prevents experimental asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 181:1310.
41. Xue, W., X. Ding, P. Tian, X. Pan, H. Yan, J. Hou, X. Feng, H. Xiang, and X. Tian. 2010. Long-term follow-up of co-administration of diltiazem and cyclosporine in Chinese kidney transplant recipients. *Ren Fail* 32:314.
42. Grgic, I., H. Wulff, I. Eichler, C. Flothmann, R. Kohler, and J. Hoyer. 2009. Blockade of T-lymphocyte KCa3.1 and Kv1.3 channels as novel immunosuppression strategy to prevent kidney allograft rejection. *Transplant Proc* 41:2601.

FIGURES

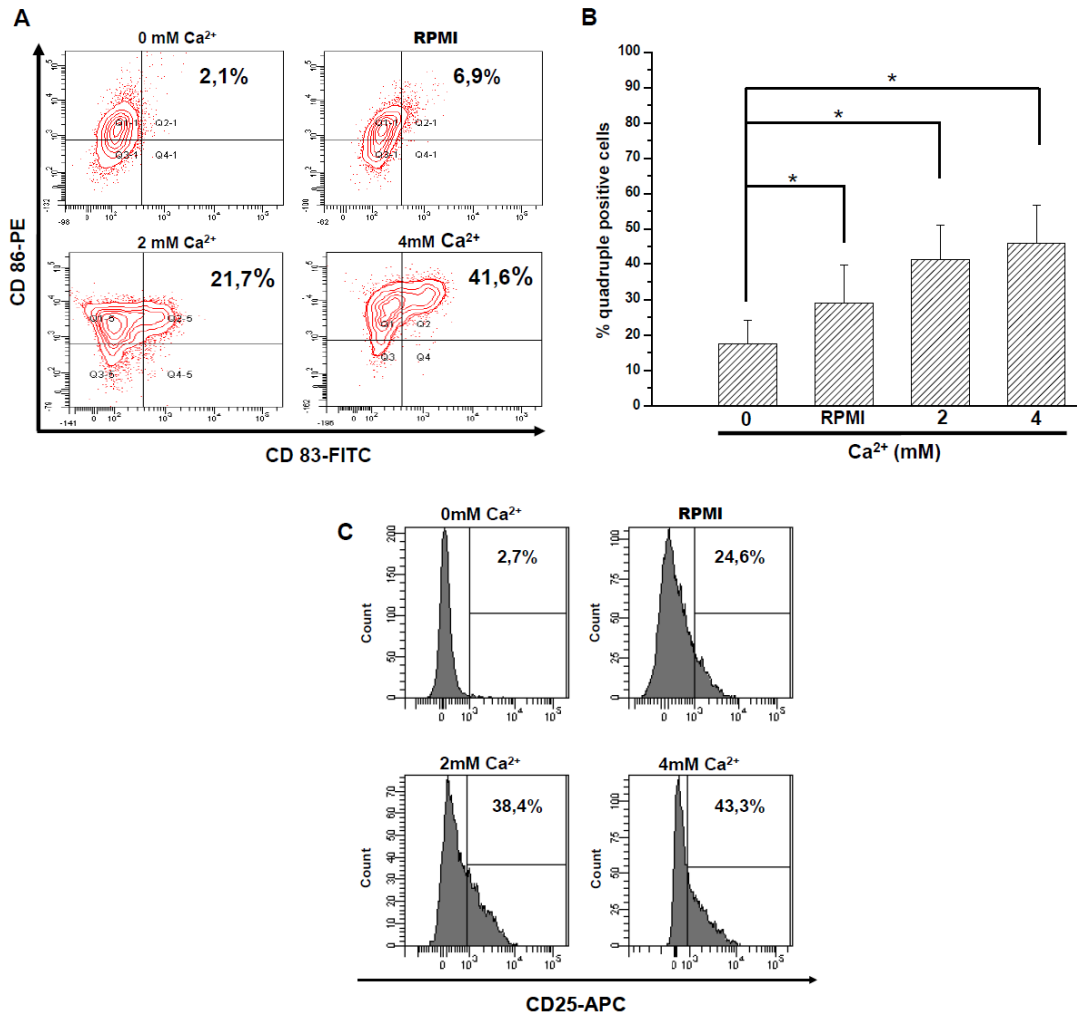


Figure 1: Expression of maturation markers in human dendritic cells according to extracellular Ca²⁺ concentration (in mM). hDC were cultured in medium with increasing concentrations of Ca²⁺. At the end of the co-culture period, cells were harvested and double or quadruple staining was assessed by FACS analysis for the 4 conditions.

A - CD83 expression is increased by extracellular Ca²⁺ concentration. The population showed on this panel is issued from a simple labelling of hDC by DC-Sign antibody. In this population, the expression of 2 specific markers: CD86 and CD83 was observed. The percentage of double positive cells is shown in panel A. Results are representative of 7 independent experiments.

B - Expression of maturation markers in relation to extracellular Ca²⁺ concentrations. The same population, isolated by simple labelling with DC-Sign antibody, expressed CD80, CD86, HLA-DR and CD83 in increasing proportions in presence of increasing extracellular Ca²⁺ concentration. The percentage of quadruple positive cells is shown in panel B. Each point represents one experiment and the black bars represent the mean of 6 independent experiments.

C - CD25 expression in relation to extracellular Ca²⁺. Analysis of CD25 expression on hDC after culture with increasing Ca²⁺ concentrations. Grey histograms represent the expression of the cell-surface markers: CD25. Results are representative of 6 independent experiments.

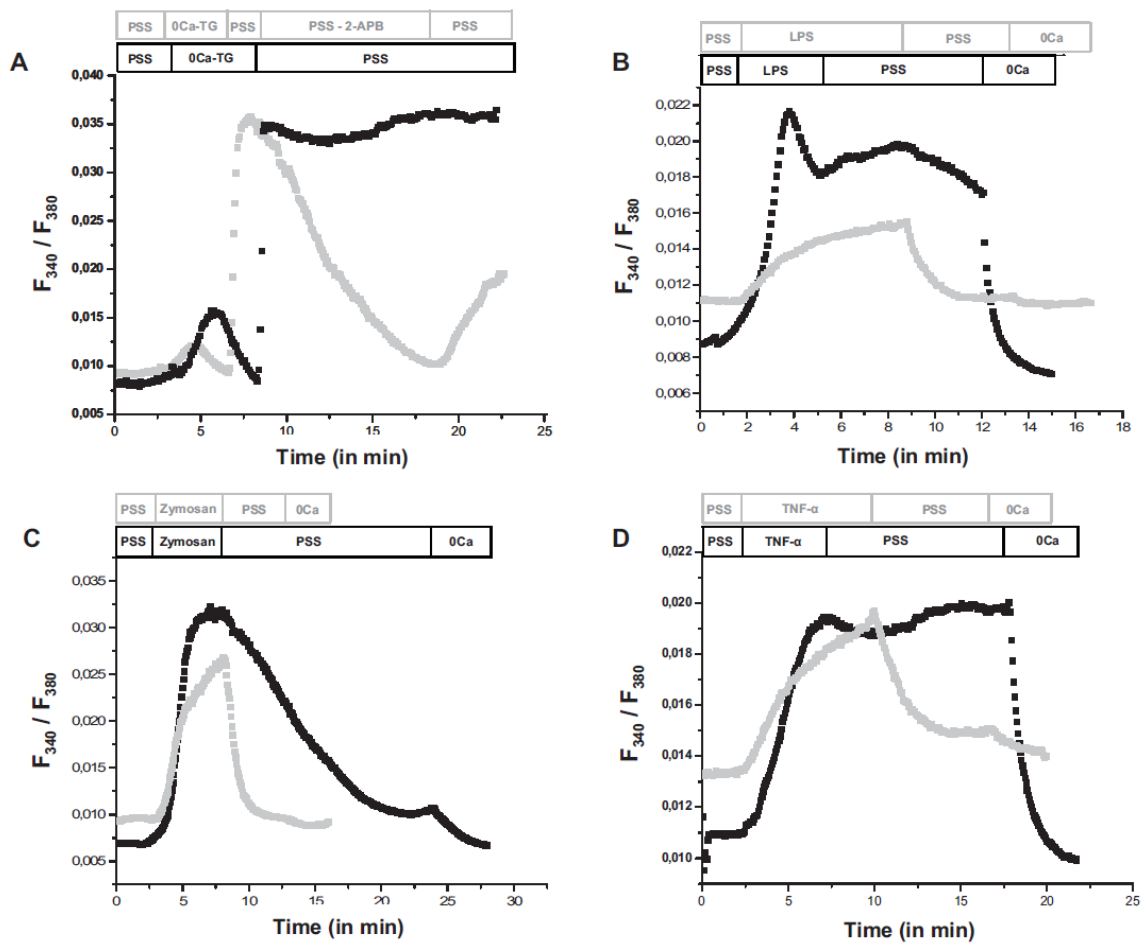


Figure 2: Characterization of a CCE during the earlier events of hDC maturation.

hDC were exposed to thapsigargin (TG), a specific inhibitor of SERCA2A, then PSS (2 mM Ca^{2+}) (A). 100µM 2-APB PSS solution induced a rapid and reversible decrease of $[Ca^{2+}]_i$ (Grey trace). According to different maturation signals (LPS, B; Zymosan, C or TNF- α , D), the variations of $[Ca^{2+}]_i$ in presence of CCE inhibitor (Grey trace, at 100µM 2-APB) or in its absence (Black trace) were observed. Results are representative of 7 independent experiments.

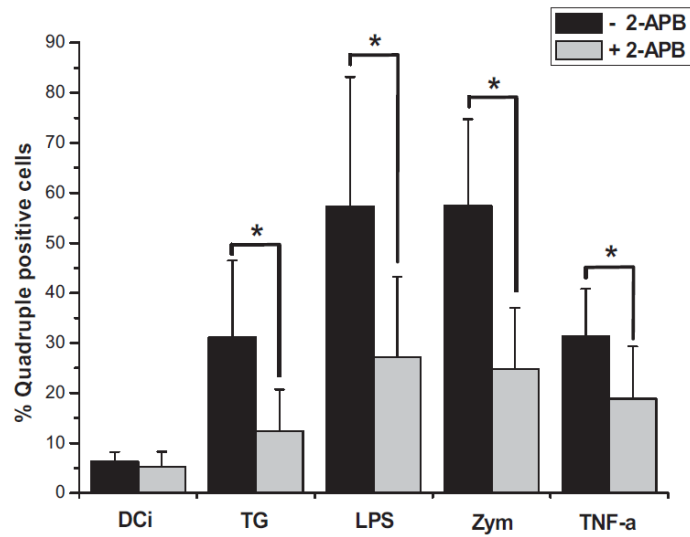


Figure 3: Expression of maturation markers in human dendritic cells treated by TG, LPS, Zymosan or TNF- α , in presence or not of 2-APB. The hDC were cultured in medium with several maturing agents (TG (750nM), LPS (50 ng/ml), Zymosan (25 μ g/ml) or TNF- α (20 ng/ml)) in absence or presence of 2-APB (a specific inhibitor of CCE). (* p <0,05, N=7)

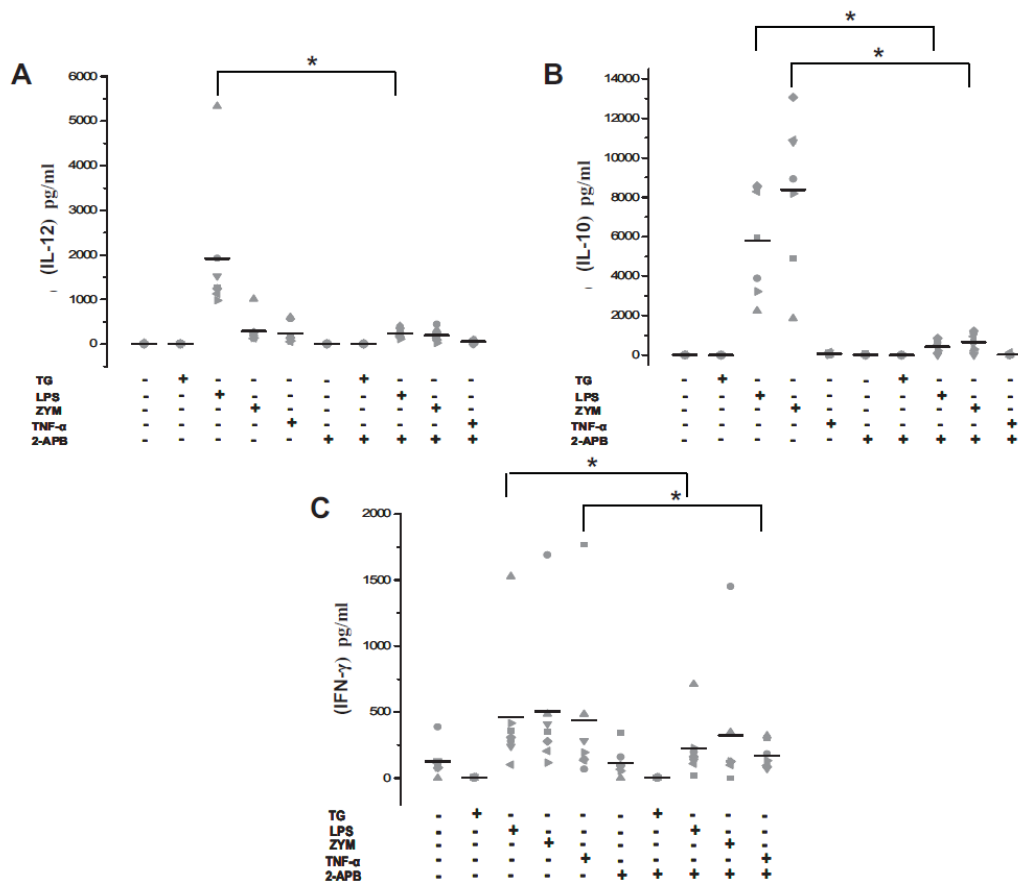


Figure 4: Ability of hDC to produce cytokines.

A, B, C - IL-12, IL-10 and IFN- γ , respectively, were isolated from supernatants of hDC treated by maturing agents (TG (750nM), LPS (50 ng/ml), Zymosan (25 μ g/ml) or TNF- α (20 ng/ml)) in presence or in absence of 100 μ M 2-APB. In each panel, the black line represents the mean of seven experiments. (*p<0,05)

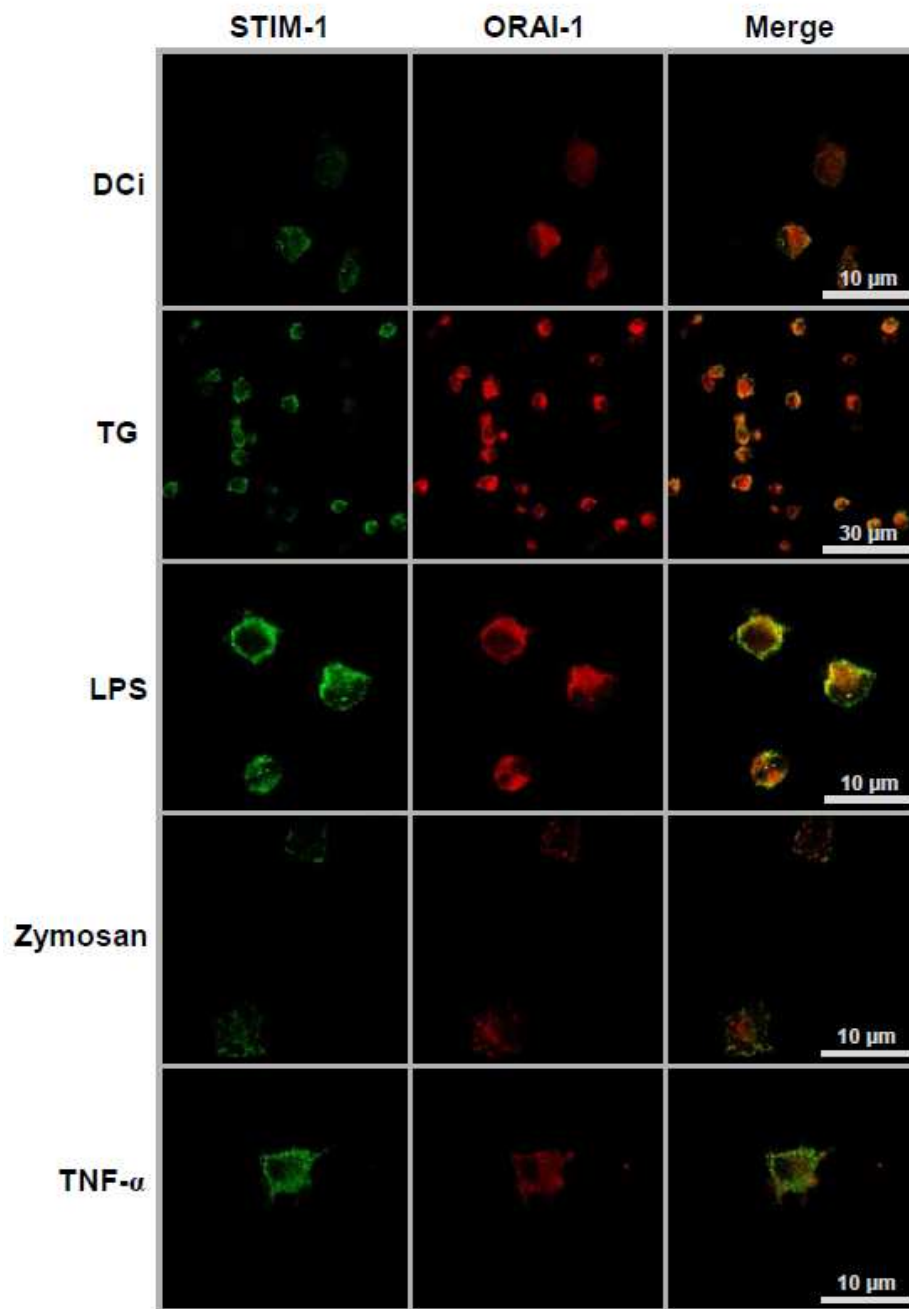


Figure 5: Presence of STIM-1 and ORAI-1 in hDC.

The expression of ORAI-1 and STIM-1 was analysed at the transcriptional (A and B) or translational (C) level. A - RT-PCR analysis of ORAI-1 showed its expression profile in reaction to maturing stimuli. The same experiment was done for STIM-1 and is shown in panel B. C - The expression of STIM-1 and ORAI-1 was analysed by the confocal microscopy, using specific antibodies coupled with a secondary antibody: Alexa Fluor®-488 for STIM-1 (green) and Alexa Fluor®-555 for ORAI-1 (red). The cells were treated, during 18 hours, with classic maturing agents (TG (750nM), LPS (50 ng/ml), Zymosan (25μg/ml) or TNF-α (20 ng/ml)). hDC were harvested and double staining was assessed by confocal microscopy.

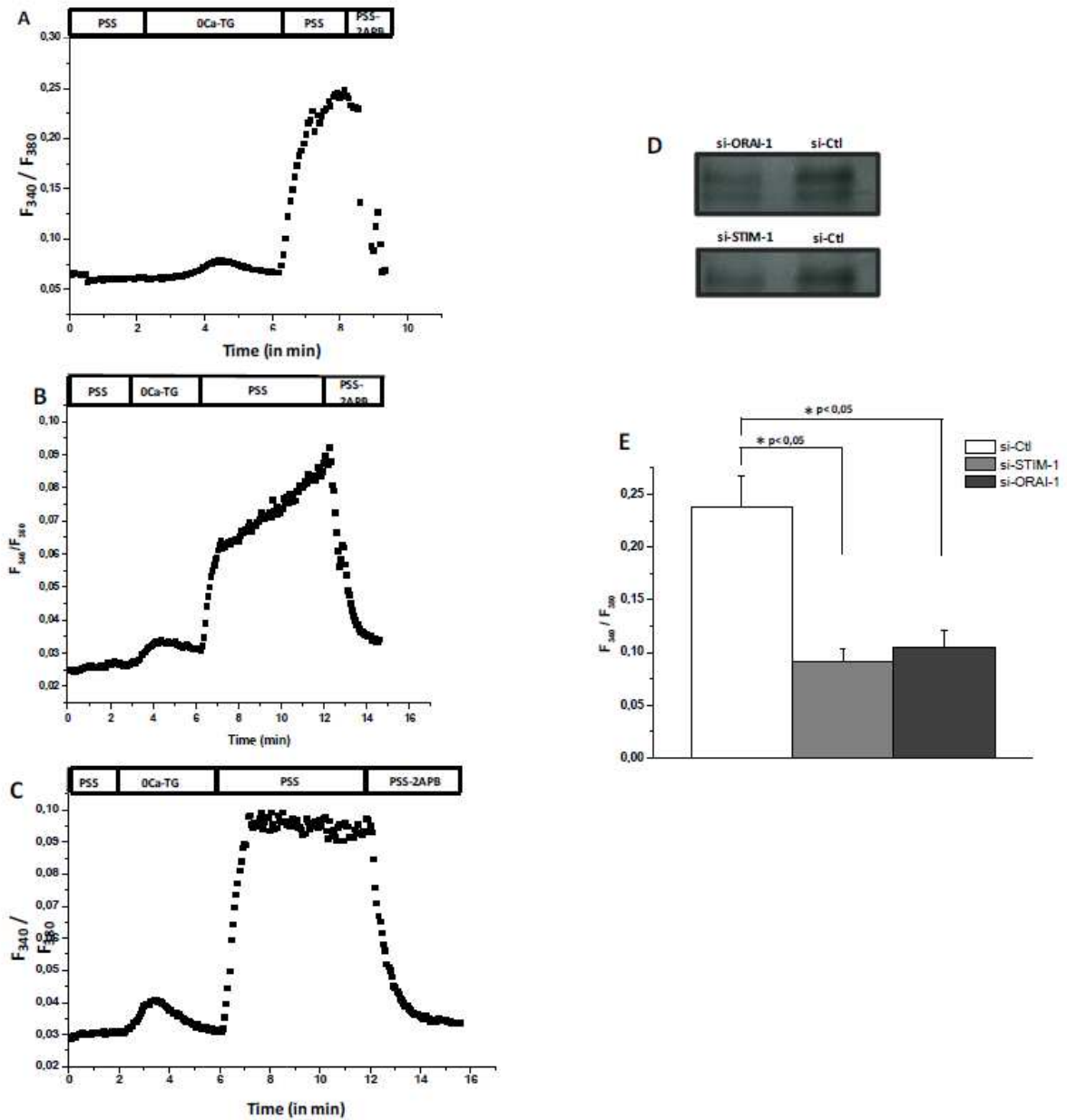


Figure 6: Characterization of a CCE in hDC transfected by specific si-RNA (si-STIM-1 and si-ORAI-1). hDC treated by specific si-RNA (Si-CTL, C; si-STIM-1, A and si-ORAI-1, B). hDC were exposed to TG (in Ca^{2+} -free solution), a specific inhibitor of SERCA-2A, after reintroduction of Ca^{2+} (PSS, 2mM), a PSS solution with 2-APB (100 μ M), a specific inhibitor of this CCE, was perfused on si-Ctl cells (A). This large Ca^{2+} rise, induced by TG, was decreased by a specific Si-RNA treatment (Si-STIM-1 in panel A and Si-ORAI-1 in panel B). Results are representative of 5 independent experiments.

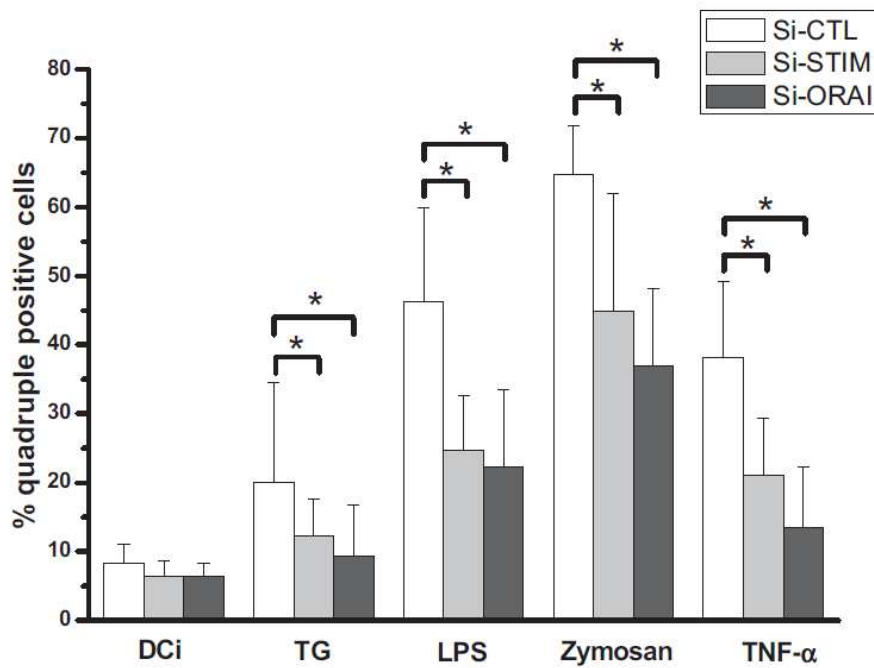


Figure 7: Expression of maturation markers on human dendritic cells treated by specific Si-RNA. hDC treated by si-CTL (white), by si-STIM-1 (light grey) or by si-ORAI-1 (dark grey) were cultured in medium with several maturing agents (TG (750nM), LPS (50 ng/ml), Zymosan (25 μ g/ml) or TNF- α (20 ng/ml)). At the end of the co-culture period, cells were harvested and quadruple staining was assessed by FACS analysis for each conditions. (*p<0,05)

Annexe 2

From www.bloodjournal.org at INSERM DISC on October 16, 2010. For personal use only.

blood

Prepublished online Jul 19, 2010;
doi:10.1182/blood-2010-02-268623

Interferon gamma licensing of human dendritic cells in T helper-independent CD8 + alloimmunity

Roxane Lemoine, Florence Velge-Roussel, Florence Herr, Romain Felix, Hubert Nivet, Yvon Lebranchu and Christophe Baron

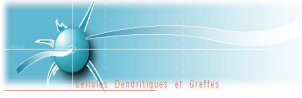
Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:
http://bloodjournal.hematologylibrary.org/misc/rights.dtl#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/misc/rights.dtl#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/subscriptions/index.dtl>

Blood (print ISSN 0006-4971, online ISSN 1528-0020), is published semimonthly by the American Society of Hematology, 1900 M St, NW, Suite 200, Washington DC 20036.
Copyright 2007 by The American Society of Hematology; all rights reserved.





HOMEOSTASIE CALCIQUE AU COURS DES EVENEMENTS PRECOCES DE LA MATURATION DES CELLULES DENDRITIQUES HUMAINES



Résumé

En transplantation d'organes, la réponse immunitaire de l'hôte contre son donneur reste une cause très importante de perte de greffons. Ainsi, un meilleur contrôle de la réponse par induction d'une tolérance spécifique reste une priorité en transplantation humaine. Dans ce projet, nous avons donc étudié l'homéostasie calcique au cours des phénomènes précoces de la maturation des cellules dendritiques (DC) humaines. Nous avons mis en évidence la présence d'une ECC (Entrée Capacitive de Calcium), dans la DC humaine, lors d'une stimulation par des agonistes des TLR (LPS ou Zymosan) ou des cytokines inflammatoires (TNF- α). De plus, cette ECC est gouvernée par le complexe ORAI-1 / STIM-1. En effet, l'absence d'expression de ces protéines induit une diminution de la maturation des DC humaines (phénotype, synthèse de cytokines). Par ailleurs, le Calcium, entré par l'ECC, va induire l'activation de canaux potassiques, sensibles à la concentration intracellulaire en Calcium : les canaux KCa3.1. Ces canaux, outre leur rôle dans la facilitation de l'ECC par hyperpolarisation de la membrane, contrôlent la migration des DC humaines. En effet, leur activation permet une sorte d'état de quiescence où les DC restent dans les tissus périphériques. L'ensemble de ces résultats obtenus, *in vitro*, suggèrent que ces canaux ioniques pourraient être une cible privilégiée pour le développement de nouvelles thérapies pour l'induction de tolérance immune en transplantation.

Mots-clés : greffe d'organe, cellules dendritiques humaines, Calcium, Potassium, canaux capacitifs, maturation, migration, cytokines

Résumé en anglais

In organ transplantation, host immune response against donor still remains a major cause of graft loss. A better control of allogeneic response through the induction of specific tolerance is a major goal in human transplantation. In this work, we studied the calcium homeostasis during the earlier events of the human dendritic cells (DC) maturation. We showed the presence of a CCE (Capacitative Calcium Entry), in the human DC, during the stimulation by TLR agonists (LPS and Zymosan) or inflammatory cytokines (TNF- α). Moreover, this CCE was managed by the ORAI-1 / STIM-1 complexe. Indeed, an inhibition of these proteins expression induced a decrease in the DC maturation (phenotype, cytokines production). Then, the Calcium, issued to CCE, could activate potassium channels, sensitive to intracellular Calcium concentration: KCa3.1 channels. These channels, excepted their role in the facilitation of CCE by membrane hyperpolarisation, control the capacity of human DC migration. Their activation induced a kind of steady state where the DC staid in peripheral tissues. These results taken together suggest that the ion channels seem to be a good target for the development of new therapies to in order to promote allograft tolerance.

Keywords: organ graft, human dendritic cells, Calcium, Potassium, CRAC channels, maturation, migration, cytokines